



TITLE:

京都大学再生医科学研究所年報 2005

AUTHOR(S):

CITATION:

京都大学再生医科学研究所年報 2005. 京都大学再生医科学研究所年報
2006, 8

ISSUE DATE:

2006-03-25

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/50578>

RIGHT:

京都大学

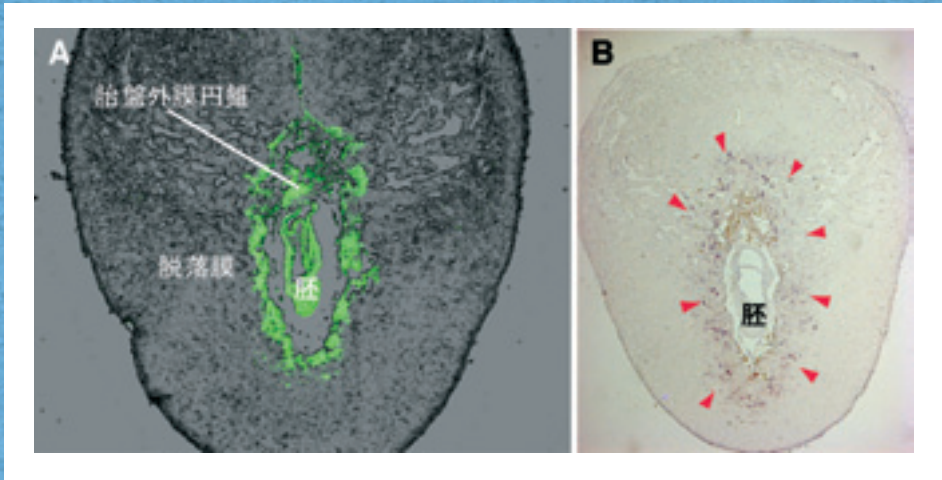
再生医科学研究所年報（第八卷）

二〇〇五

京都大学

再生医科学研究所年報

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University



〈第 8 卷〉

2005
平成17年

表紙写真

妊娠マウス7.5日目における母体－胎仔境界の様子。胎仔由来の栄養膜細胞（緑色）は母体組織である脱着膜へと浸潤し、母体血管網と連結する（図A）。栄養膜細胞の浸潤は脱着膜によって巧妙に制御され、適切な組織改変を経て、やがて胎盤が形成される。軟骨由来血管新生抑制因子 Chondromodulin-I は栄養膜細胞を取囲む成熟な脱着膜で発現している。（図B；矢頭）

目 次

| | |
|----------------------------|-----|
| 1. 巻頭言 | 1 |
| 2. 京都大学再生医科学研究所概要 | |
| 2-1 沿革 | 2 |
| 2-2 教員数等 | 2 |
| (1) 教員 | 2 |
| (2) 大学院生・研修員・研究生等 | 2 |
| 2-3 組織図 | 3 |
| 3. 研究概要と研究業績 | |
| 生体機能学研究部門 | |
| 細胞機能調節学分野 | 4 |
| 生体微細構造学分野 | 12 |
| 生体機能調節学分野 | 16 |
| 生体システム制御学分野 | 22 |
| 生体組織工学研究部門 | |
| 生体分子設計学分野 | 26 |
| 生体材料学分野 | 31 |
| 組織修復材料学分野 | 58 |
| 再生統御学研究部門 | |
| 発生分化研究分野 | 66 |
| 再生誘導研究分野 | 69 |
| 再生増殖制御学分野 | 75 |
| 再生免疫学分野 | 79 |
| 再生医学応用研究部門 | |
| 組織再生応用分野 | 83 |
| 器官形成応用分野 | 89 |
| 臓器再建応用分野 | 92 |
| 附属再生実験動物施設 | 100 |
| 附属幹細胞医学研究センター | |
| 霊長類胚性幹細胞研究領域 | 104 |
| 幹細胞分化制御研究領域 | 107 |
| 幹細胞加工研究領域 | 112 |
| 細胞プロセッシング研究領域 | 117 |
| 附属ナノ再生医工学研究センター | |
| ナノバイオプロセス研究領域 | 118 |
| シミュレーション医工学研究領域 | 123 |
| ナノバイオメカニズム研究領域 | 132 |
| 寄附研究部門 | |
| 組織分化制御学研究部門 | 139 |
| 技術部 | 142 |
| 4. ナノメディシン融合教育ユニット | 144 |
| 5. 学術集会 | |
| 5-1 再生医科学研究所学術講演会 | 145 |
| 5-2 セミナー | 146 |
| 5-3 研究発表会 | 148 |
| 5-4 学術講演会・シンポジウム・研究会 | 149 |
| 6. 協議員・教職員・その他構成員名簿 | 151 |

1. 巻 頭 言

再生医科学研究所が「生体組織及び臓器の再生に関する学理及びその応用の研究」を目的として平成10年4月に設置されてから8年が経過しようとしています。この間、再生医学および再生医療が国内外で注目を浴びると同時に、画期的な再生治療の実現が期待されています。再生医学の発展には生命科学、医学と工学を統合した学際的融合的研究が不可欠であり、多様な学問分野を基盤とする研究者が共に研究を押し進める再生医科学研究所はその中核的役割を果たすことを目指して引き続き努力したいと考えています。

平成17年には、文部科学省の特別教育研究経費により、「再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターにおける、新たなES細胞（臨床応用用ES細胞）樹立のプロジェクト研究」が5年間計画で措置されました。この予算によって、細胞プロセッシング研究領域を新設して、東京大学医科学研究所の高橋恒夫特任教授を客員教授として指導をお願いするとともに、医療応用のための品質管理専門家を採用しました。17年度末には、ヒトES細胞用セルプロセッシングセンターの建設が竣工する予定です。

研究所の人事異動としては、発生分化研究分野の斎藤哲一郎助教授が千葉大学大学院医学研究院教授として転出しました。また、京都大学に新たに設けられた特定有期雇用教員制度を活用して、特任講師と特任助手あわせて4名が採用されました。

平成16年4月に法人化した国立大学は、政府予算の削減の中で厳しい時代を迎えています。社会の中でどのような役割を果たすべきか、私どもの再生医科学研究所は再生医学の基礎と応用研究という明確な目的をもつ研究所であることを基本線として、真に社会に貢献したと評価される研究所になりたいと考えています。引き続き皆様のご支援とご助言を宜しくお願い申し上げます。

平成18年1月

所 長 中 辻 憲 夫

2. 京都大学再生医科学研究所概要

2-1 沿革

本研究所は、平成10年4月9日に設置された。その前身である胸部疾患研究所は、昭和16年3月に「結核の予防及び治療」を主軸とする結核研究所として設置され、昭和42年6月には結核胸部疾患研究所に名称変更、さらに昭和63年4月には「胸部疾患に関する学理及びその応用の研究」を目的とした胸部疾患研究所への全面改組が行われたが、胸部疾患に関する研究・治療を取り巻く社会的要請の変化から、胸部疾患研究所は57年間にわたる使命を終え、平成10年度より、同研究所基礎系分野及び臨床系分野の一部を人工臓器の研究・開発に関して顕著な業績を挙げて来た生体医療工学研究センターと統合し、さらに実地臨床医学を行う医学研究科との協力により、「生体組織及び臓器の再生に関する学理及びその応用の研究」を目的とする再生医科学研究所に改組・転換された。

改組・転換に伴い、胸部疾患研究所の臨床系分野の一部と研究所附属病院は、大学院医学研究科・医学部並びに医学部附属病院へそれぞれ引き継がれた。

本研究所は、平成10年4月の発足時は5大研究部門と附属再生実験動物施設で組織された。その後平成14年4月に附属幹細胞医学研究センターが設置され、平成16年4月に研究部門の再編(1大研究部門減)の実施によりナノ再生医工学研究センターが設置された。平成16年10月には、住友電気工業(株)の寄附による寄附研究部門が設置され、よって、現在4大研究部門(生体機能学、生体組織工学、再生統御学、再生医学応用)、3附属施設、1寄附研究部門となっている。平成17年10月には、工学研究科、医学研究科とともに、ナノメディシン融合教育ユニットに参加した。

本研究所は生命科学、医学、工学などの研究者が結集して再生医学の学際的基礎研究を押し進め、その成果の医学応用をめざすとともに、ヒトES細胞株の国内唯一の樹立機関として、樹立・特性解析を行ったES細胞を、文部科学大臣が確認したヒトES細胞使用研究機関へ分配するナショナルバイオリソース事業を実施している。

主な建物は、再生医科学研究所西館(旧胸部疾患研究所附属病院の後身である医学部附属病院南西病棟と合同使用)、再生医科学研究所東館(旧生体医療工学研究センター)、ES細胞研究棟(平成14年竣工)、南部総合研究実験棟(ウイルス研、医学研究科との3部局合同使用)(平成14年竣工)の4棟となっている。

2-2 教員数等

(1) 教員 (平成18年1月1日現在)

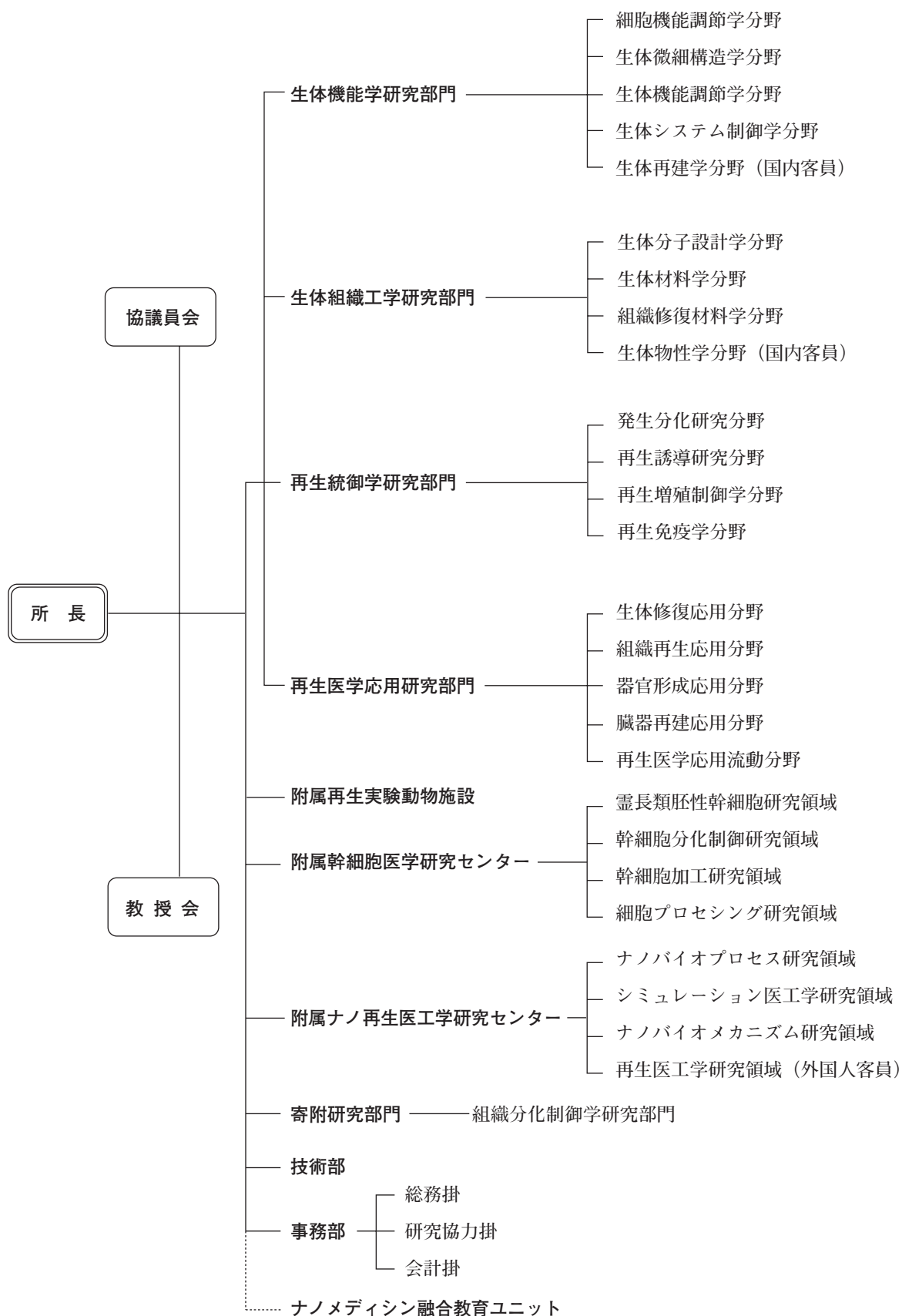
| 区 分 | 教 授 | 助 教 授 | 助 手 | 計 |
|-----|----------|-------|-----|----------|
| 定 員 | 18(2)<1> | 19(1) | 3 | 40(3)<1> |

() は国内客員で外数
< > は外国人客員で外数

(2) 大学院生・研修員・研究生等 (平成18年1月1日現在)

| 大 学 院 生 | 研 修 員 | 研 究 生 | 外国人共同研究者等 |
|---------|-------|-------|-----------|
| 111 | 6 | 15 | 4 |

2-3 組織図



3. 研究概要と研究業績

生体機能学研究部門

細胞機能調節学分野

Department of Molecular and Cellular Biology

分野主任 教授 永田 和宏

Prof. Kazuhiro Nagata

【研究概要】

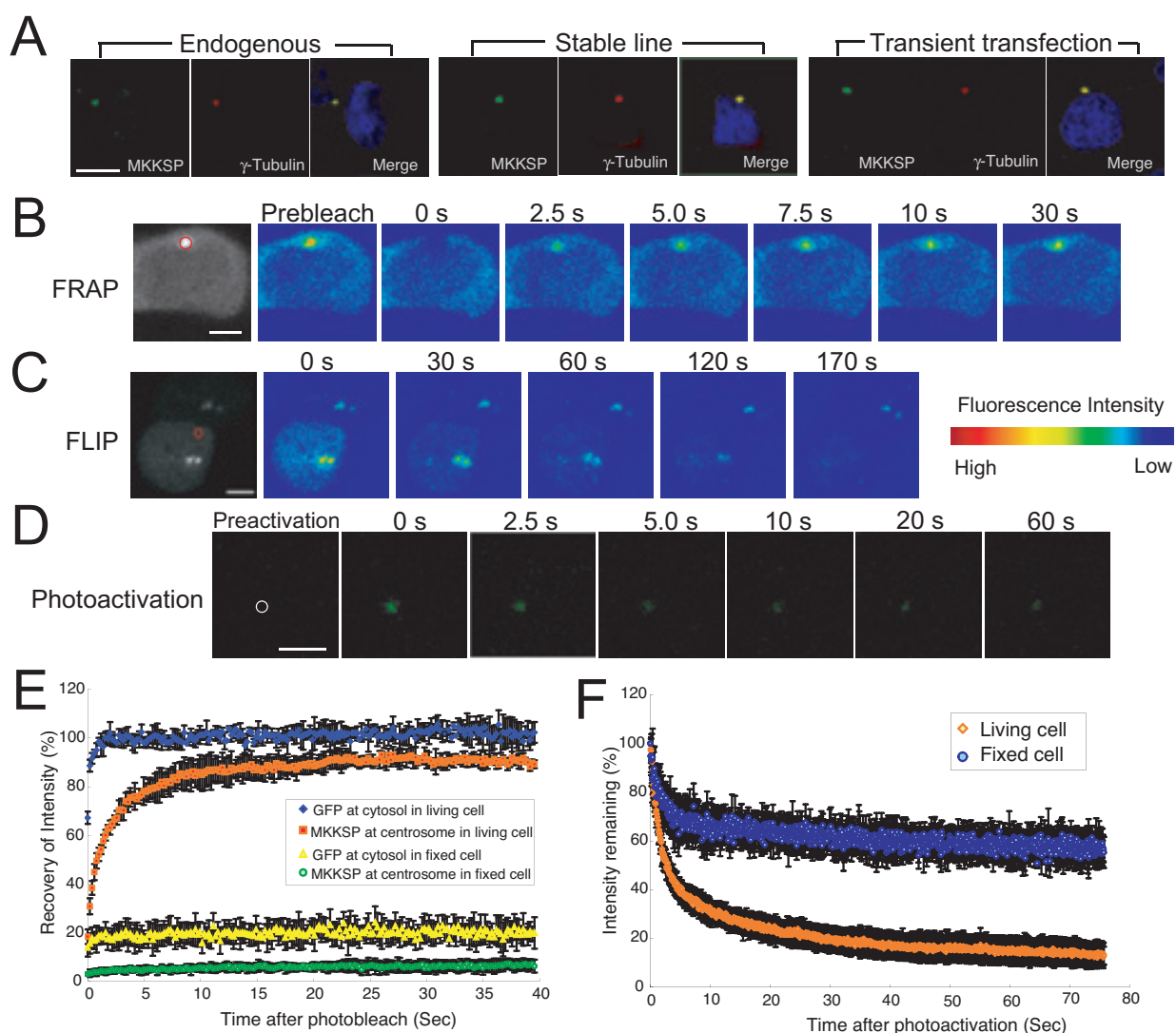
細胞機能調節学分野では、分子シャペロンの機能解析を中心に、再生現象の分子基盤とも言うべきタンパク質の合成・再生・品質管理の機構について、具体的には以下の3つの大きなテーマに添って、研究を進めている。

第1のテーマは、小胞体における productive folding に関する研究であり、コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の機能解析を中心に研究を進めている。HSP47 はコラーゲンの正常な合成・分泌にとって必須の分子シャペロンであることを明らかにしてきたが、HSP47 は組織の繊維化にとっても重要な寄与をしている。HSP47 の発現を抑制することによって繊維化の進行を遅らせることができるというデータから、HSP47 の抑制を介した繊維化疾患の治療戦略が考えられている。HSP47 ノックアウトマウス、および HSP47 ノックアウト ES 細胞を用いた研究より、HSP47 が I 型及び IV 型コラーゲンの分子成熟(3 本鎖形成)に必須の分子シャペロンであることを明らかにし、HSP47 null mouse では基底膜への IV 型コラーゲンの蓄積が見られず、10.5 日齢の embryo では基底膜が断裂すること、また IV 型コラーゲンが細胞内の小胞体に蓄積し、これが小胞体ストレスとなって、アポトーシスが引き起こされることなどを明らかにしてきた。本年度は分泌された I 型コラーゲンの細胞外マトリックス中での繊維形成能を詳細に解析した。HSP47 ノックアウト細胞においては、I 型コラーゲンの繊維形成が極めて貧弱であり、コラーゲン繊維は細い、しかも枝分かれのある繊維から成っていることが明らかになった。これはプロコラーゲンのプロセッシングに異常があることに由来し、実際に N プロペプチドの切断されていないコラーゲンが細胞外マトリックス中に蓄積していた。また、これら分泌遅延を起こしたプロコラーゲンは小胞体中に不溶性の凝集体として蓄積していることを示した。現在、基質であるコラーゲンとどのような部位を介して相互作用しているのかを明らかにするため、HSP47 の種々のアミノ酸に変異を入れ、コラーゲンとの結合性を調べることにより、HSP47 の基質結合ドメインの特定を進めつつある。(文責・永田)

第2のテーマとして、小胞体品質管理(ERQC)、小胞体関連分解(ERAD)の作用機序の解明を、細胞および分子レベルで行っている。ERQC, ERAD に関しては、遺伝子レベルで mutation をもったタンパク質が ERAD 機構によって分解されたり、あるいは ERQC の破綻が疾患を引き起こすことが明らかにされ、臨床・疾病治療の面からも注目されている。ERAD に関わる EDEM ホモログタンパク質は、酵母では1種類、哺乳類では3種類あることが明らかにされた。いずれも糖タンパク質の ERAD を促進するが、その分子メカニズムは異なっているようなので、その違いを明らかにするとともに、EDEM ファミリーを包括する機能の解明を行いたいと考えている。さらに、ERQC における N 結合型糖鎖の役割、タンパク質の小胞体からの逆行輸送に関与する分子、小胞体膜上でタンパ

ク質をユビキチン化する分子の研究も行っており、いずれも独自の視点に立った研究を進めている。(文責・細川)

第3のテーマである細胞質シャペロニン CCTの研究に関しては、全てをリコンビナントタンパク質により構成される無細胞タンパク質合成系である Pure system に、精製した CCT を加えることにより、CCT と生合成直後のポリペプチド鎖との相互作用を解析できる系を確立した。この系を用いて、三量体 G タンパク質の β サブユニットとの相互作用を解析し、CCT は疎水的 β シートを認識してその凝集を抑えることを見いだした。さらに、RNAi 法により細胞内の CCT をノックダウンできる系を確立し、CCT 量の減少は、ポリグルタミンなどの β シートを介して凝集するタンパク質に対して促進的に作用することを見いだした。したがって、CCT には、非常に凝集しやすく細胞にとって毒性を示す疎水的 β シートタンパク質にたいして、その凝集を抑えるという重要な働きがあるものと考えられる。また、CCT と弱いながらも相同性を示し、いくつかの先天的疾患の原因として知られる MKKS タンパク質に関して、中心体へ行き来し、他の分子シャペロンと相互作用することがわかったので、中心体を介したタンパク質の品質管理に関わっている可能性がある。MKKS の病気をおこす変異型は、凝集しやすく、



シャペロニン様 MKKS タンパク質の中心体局在と、ライブイメージング法によるダイナミクスの解析

(A) MKKS タンパク質の免疫染色。中心体マーカーである γ チューブリンと 2 重染色した。(B) MKKS の FRAP 解析。中心体の GFP-MKKS を瞬時に消光させ、サイトゾルからの移行を経時的に観察した。(C) MKKS の FLIP 解析。サイトゾルを消光させ続けることにより、GFP-MKKS の中心体からサイトゾルへの移行を観察した。(D) MKKS の photoactivation 解析。中心体の PS-CFP-MKKS を光照射により異なる蛍光型に転換させ、その特異波長を観察することにより、中心体からサイトゾルへの移行を観察した。(E) FRAP 解析の定量データ。(F) Photoactivation 解析の定量データ。以上の実験から、MKKS は中心体とサイトゾルの間を数秒のオーダーで行き来していることがわかる。

プロテアソーム依存的に急速に分解されるので、これが病気を起こす一因と考えられる。 (文責・久保田)

The major focus in the Department of Molecular and Cellular Biology is to study the stress response and the regulation and function of molecular chaperone/stress proteins. We are working mainly on the three topics in this field.

We found and cloned the gene of a novel stress protein HSP47 which resides in the endoplasmic reticulum (ER) acting as a collagen-specific molecular chaperone in the pathway of collagen biosynthesis, processing and secretion. HSP47 specifically and transiently binds to various types of collagen in the ER. In addition to the binding specificity to collagen, the expression of HSP47 is always closely correlated with those of collagens during the normal development of mouse embryo as well as in the pathophysiological conditions including liver and renal fibrosis.

We already succeeded in making knockout mice lacking *hsp47* gene, which resulted in causing the embryonic lethality at 10.5 dpc in *hsp47*^{-/-} homozygotic mice. In these homozygotic mice, the maturation of type I collagen was abnormal and the immature form of procollagen accumulated in the tissues. Using *hsp47*^{-/-} ES cells, we found this year that type IV collagen secreted from *hsp47*-null cells could not form correct triple helices and the basement membrane was not observed in the embryoid bodies formed from those cells. We also observed the impairment of basement membrane formation in mouse embryos, thus these findings reveal that the knockout of a chaperone protein HSP47 causes the abnormality in molecular maturation of procollagen, and HSP47 is essential for mouse normal development. In those knockout mice, type IV collagen was observed to accumulate in the ER causing an ER stress, and apoptosis was also observed in those embryos after 10.5 dpc. (By K. Nagata)

Another project we are working is to study on the molecular mechanism of ERQC (ER quality control) and ERAD (ER-associated degradation). Many works have clarified the importance of ERAD of misfolded proteins and the disruption of ERQC in genetic diseases and neurodegenerative disorders. We have previously cloned a mouse gene EDEM, which is involved in the ERAD of glycoproteins. There are three EDEM homolog proteins in mammals and one paralog in yeast. Although all of the homologs enhance glycoprotein ERAD, the molecular mechanisms of each proteins seem to be different. We are now investigating the functional divergence as well as the comprehensive mechanism of these EDEM family proteins. We are also working to elucidate the involvement of N-linked sugars on the ERQC, the molecular mechanism of retrotranslocation of misfolded substrates, and the molecules responsible for the ubiquitylation of ERAD substrates on the ER membrane. (By N. Hosokawa)

To study the biochemical function of cytosolic chaperonin CCT, we established a system for evaluating interaction between CCT and newly-synthesized polypeptides by adding purified CCT to 'Pure system'. We used this system to analyze interaction between CCT and trimeric G protein β subunit and found that CCT recognizes hydrophobic β sheets of this protein. We also established RNAi knockdown system to deplete CCT subunits in human cultured cells, and found that CCT knockdown stimulates aggregation of polyglutamine expanded proteins, which are known to produce β -sheet-mediated aggregates. Thus, CCT plays an important role in preventing hydrophobic β sheets, which are highly prone to aggregation and toxic to the cell. In addition, we analyzed MKKS protein that shows weak homology to CCT. MKKS proteins was found to be shuttled between the centrosome and cytosol and associated with other molecular chaperones. MKKS protein might play a role in protein quality control in or via the centrosome. As disease-causing mutants of MKKS protein tends to aggregate and degraded rapidly by proteasome-dependent system, this is probably a cause for the disease. (By H. Kubota)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bächinger, H. P., Nagata, K. : Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in ER and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol. Biol. Cell.* in press
- Hosokawa, N., Wada, I., Natsuka, Y., Nagata, K. : EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded α 1-antitrypsin. *Genes Cells.* in press
- Hirao, K., Natsuka, Y., Tamura, T., Wada, I., Morito, D., Natsuka, S., Romero, P., Sleno, B., Tremblay, L.O., Herscovics, A., Nagata, K., Hosokawa, N. : EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein ERAD and mannose trimming. *J. Biol. Chem.* in press
- Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R.J., Nagata, K., Mori, K. : Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J. Cell. Biol.* in press
- Koide, T., Nishikawa, Y., Asada, S., Yamazaki, C. M., Takahara, Y., Homma, D. L., Otaka, A., Wakamiya, N., Nagata, K., Kitagawa, K. : Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J. Biol. Chem.* in press
- Koide, T., Asada, S., Takahara, Y., Nishikawa, Y., Nagata, K., Kitagawa, K. : Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. Minimal structural requirement and spatial molecular orientation. *J. Biol. Chem.* in press
- Hirai, K., Kikuchi, S., Kurita, A., Ohashi, S., Adachi, E., Matsuoka, Y., Nagata, K., Watanabe, M. : Immunohistochemical distribution of heat shock protein 47 (HSP47) in scirrhous carcinoma of the stomach. *Anticancer Research.* in press
- Chiba, S., Yokota, S.I., Yonekura, K., Tanaka, S., Furuyama, H., Kubota, H., Fujii, N., Matsumoto, H. : Autoantibodies against HSP70 family proteins were detected in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* in press
- Murata, Y., Homma, T., Kitagawa, E., Momose, Y., Sato, S. M., Odani, M., Shimizu, H., Hasagawa-Mizusawa, M., Matsumoto, R., Mizukami, S., Fujita, K., Parveen, M., Komatsu, Y., Iwahashi, H. : Genome wide expression analysis of yeast response during exposure to 4. *C. Extremophiles.* in press
- Naitoh, M., Kubota, H., Ikeda, M., Tanaka, T., Sirane, H., Suzuki, S., Nagata, K. : Gene expression in human keloids is altered from dermal to chondrocytic and osteogenic lineage. *Genes Cells.* **10** : 1081-1091 (2005)
- Kano, F., Kondo, H., Yamamoto, A., Tanaka, A.R., Hosokawa, N., Nagata, K., Murata, M. : The maintenance of the endoplasmic reticulum network is regulated by p47, a cofactor of p97, through phosphorylation by cdc2 kinase. *Genes Cells.* **10** : 333-344 (2005)
- Kano, F., Kondo, H., Yamamoto, A., Kaneko, Y., Uchiyama, K., Hosokawa, N., Nagata, K., Murata, M. : NSF/SNAPs and p97/p47/VCIP135 are sequentially required for cell cycle-dependent reformation of the ER network. *Genes Cells.* **10** : 989-999 (2005)
- Yoshinaga, T., Nakatome, K., Nozaki, J., Naitoh, M., Hoseki, J., Kubota, H., Nagata, K., Koizumi, A. : Proinsulin lacking the A7-B7 disulfide bond, *Ins2 Akita*, tends to aggregate due to the exposed hydrophobic surface. *Biol. Chem.*

386 : 1077-1085 (2005)

Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., Tada, T. : Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional *cis* Regulation of *Nanog* Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **25** : 2475-2485 (2005)

2) 著書および総説

Koide T. & Nagata K. : Collagen Biosynthesis “Topics in Current Chemistry : Collagen 247” (Eds Brinckmann et al.) Springer-Verlag pp. 85-114 (2005)

永田和宏, 遠藤斗志也 : 序 : タンパク質社会学とは何か. 実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏, 遠藤斗志也編) Vol. 23, No. 15 (2005)

永田和宏 : タンパク質社会における危機管理システム. 実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏, 遠藤斗志也編) Vol. 23, No. 15 : 2321-2326 (2005)

細川暢子 : 小胞体タンパク質の品質を保証する細胞内メカニズム. 化学と生物 Vol. 43, No. 9 : 600-606 (2005)

久保田広志, 永田和宏 : コラーゲンと分子シャペロン. ティッシュエンジニアリング2006 (日本組織工学会編) in press

久保田広志 : シャペロニンファミリータンパク質-その普遍性と多様性. 実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏, 遠藤斗志也編) Vol. 23, No. 15 : 2266-2271 (2005)

長束優子, 細川暢子, 永田和宏 : 小胞体関連分解における EDEM ファミリータンパク質の機能. 実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏, 遠藤斗志也編) Vol. 23, No. 15 : 2352-2357 (2005)

小田裕香子, 森和俊 : 小胞体ストレス応答によって制御される Derlins. 実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏, 遠藤斗志也編) Vol. 23, No. 15 : 2345-2351 (2005)

J. F. Morley, R. I. Morimoto, 永田和宏 (訳) : ポリグルタミン病の線虫モデル. 実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏, 遠藤斗志也編) Vol. 23, No. 15 : 2391-2399 (2005)

遠藤斗志也, 永田和宏 : 概論 : タンパク質の一生とタンパク質社会学. 実験医学「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏, 遠藤斗志也編) Vol. 23, No. 15 : 2228-2233 (2005)

石川統, 黒岩常祥, 永田和宏編 : 細胞生物学事典. 朝倉書店 (2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Nobuko Hosokawa : Alpha-mannosidase-like proteins accelerate glycoprotein ERAD. 基盤研究 C 企画調査「タンパク質の多様性獲得戦略の解明に基づいたゲノム情報の解説」シンポジウム「Strategies for the acquirement of functional diversity of proteins タンパク質の多様性は限られたゲノム情報からいかにして生み出されるか?」, 東京都, 2005. 1. 20

Nobuko Hosokawa, Kazuyoshi Hirao, Yuko Natsuka, Junji Nakamura, Daisuke Morito, Ikuo Wada, Barry Sleno, Linda O. Tremblay, Annette Herscovics, Kazuhiro Nagata : A novel soluble EDEM homolog enhances glycoprotein ERAD. 2005 ASBMB Annual Meeting, San Diego (USA), 2005. 4. 2-6

細川暢子 : 糖タンパク質の小胞体品質管理機構. 文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第3回夏期シンポジウム, 岐阜市, 2005. 8. 8-9

- Nobuko Hosokawa, Kazuyoshi Hirao, Junji Nakamura, Daisuke Morito, Yuko Natsuka, Ikuo Wada, Pedro Romero, Barry Sleno, Linda O. Tremblay, Annette Herscovics, Kazuhiro Nagata : A novel soluble EDEM homolog enhances glycoprotein ERAD. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 10. 30-11. 3
- 細川暢子, 平尾和義, 中村純治, 森戸大介, 長束優子, 和田郁夫, Pedro Romero, Barry Sleno, Linda O. Tremblay, Annette Herscovics, 永田和宏 : EDEM3 たんぱく質は糖たんぱく質の分解を促進する. 2005 年度科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 “たんぱく質関連領域” 合同シンポジウム, 豊中市, 2005. 11. 15-16
- Hiroshi Kubota, Yuji Yamazaki, Akira Kitamura, Yukako Oda, Shoshiro Hirayama, Kazuhiro Nagata : Mckusich-Kaufman syndrome gene product is a chaperonin-like molecule abundant in the centrosome and degraded upon disease-causing mutation. 第 58 回日本細胞生物学会大会, さいたま市, 2005. 6. 14-17
- Hiroshi Kubota, Yuji Yamazaki, Akira Kitamura, Yukako Oda, Shosiro Hirayama, Kazuhiro Nagata : Mckusick-Kaufman syndrome gene product is a chaperonin-like protein shuttling between the centrosome and cytosol and degraded upon disease-causing mutations. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 10. 30-11.3
- Hiroshi Kubota, Yasuhiko Matsuoka, Takayuki Homma, Akira Kitamura, Kazuhiro Nagata : Hydrophobic residues neighboring the serpin loop of HSP47 is required for collagen binding. 6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hawaii (USA), 2005. 11. 30-12.5
- Yuko Natsuka : Cloning, expression, and characterization of EDEM homolog proteins. Gordon Research Conference on Glycobiology, Ventura (USA), 2005. 3. 8
- Yuko Natsuka, Kazuyoshi Hirao, Junji Nakamura, Taku Tamura, Ikuo Wada, Shunji Natsuka, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Functional analysis of EDEM homologue protein. 第 58 回日本細胞生物学会大会, さいたま市, 2005. 6. 14-17
- 長束優子, 平尾和義, 中村純治, 田村拓, 和田郁夫, 長束俊治, 細川暢子, 永田和宏 : EDEM 可溶性ホモログ EDEM3はマンノシダーゼ活性を介してERADを促進する. 第25回日本糖質学会年会, 大津市, 2005. 7. 20-22
- 森戸大介 : 小胞体関連分解に関わるユビキチンリガーゼの機能解析. 第 1 回再生研若手研究発表会, 京都市, 2005. 3. 9
- Daisuke Morito, Kazuyoshi Hirao, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Dissection of functional differences between two mammalian Hrd1p orthologues : gp78 and mHRD1. 第 58 回日本細胞生物学会大会, さいたま市, 2005. 6. 14-17
- Daisuke Morito, Kazuyoshi Hirao, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Dissection of functional differences between two mammalian Hrd1p orthologues : gp78 and mHRD1. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 10. 30-11.3
- 森戸大介, 平尾和義, 細川暢子, 永田和宏 : 小胞体関連分解におけるユビキチンリガーゼの機能分担. 2005 年度 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 “たんぱく質関連領域” 合同シンポジウム, 豊中市, 2005. 11. 15-16
- 松岡泰弘 : コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の機能解析. 第 1 回再生研若手研究発表会, 京都市, 2005. 3. 9
- Yasuhiko Matsuoka, Hiroshi Kubota, Akira Kitamura, Kazuhiro Nagata : Analysis of the collagen-binding sites by mutation of the ER molecular chaperone HSP47. 第 58 回日本細胞生物学会大会, さいたま市, 2005. 6. 14-17
- Yukako Oda, Tetsuya Okada, Hiderou Yoshida, Randal J. Kaufman, Kazuhiro Nagata, Kazutoshi Mori : Derlin-2 Derlin-3 regulated by mammalian unfolded protein response are required for ER-associated degradation. Second Inter-

- national Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, Tomar (Portugal), 2005. 9. 25
- Yukako Oda, Tetsuya Okada, Hiderou Yoshida, Randal J. kaufman, Kazuhiro Nagata, Kazutoshi Mori : Darlin-2 and Darlin-3 regulated by mammalian Unfolded Protein Response are required for ER-associated Degradation. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 10. 30-11.3
- Susumu Kubota, Hiroshi Kubota, Kazuhiro Nagata : Cytosolic chaperonin CCT prevents WD40 repeat protein G β from aggregation by trapping a hydrophobic surface of β -strands. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005.10.30-11.3
- 久保田進, 久保田広志, 永田和宏 : 細胞質シャペロニン CCT は三量体 G タンパク質 β サブユニット (G β) の疎水性 β ストランドを認識しその凝集を抑制する. 2005 年度 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 “たんぱく質関連領域” 合同シンポジウム, 豊中市, 2005. 11. 15-16
- Koji Nagasawa, Toshio Higashi, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : TRAP complex is involved in ERAD pathway. 第 58 回日本細胞生物学会大会, さいたま市, 2005. 6. 14-17
- Koji Nagasawa, Toshio Higashi, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata : Involvement of TRAP complex in ERAD pathway. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 10. 30-11. 3
- Akira Kitamura, Hiroshi Kubota, Kazuhiro Nagata : Aggregation of actin and tubulin by RNAi-mediated knockdown of cytosolic chaperonin CCT in human cells. 第 58 回日本細胞生物学会大会, さいたま市, 2005. 6. 14-17
- Yoshihito Ishida, Hiroshi Kubota, Hans-Peter Bachinger, Kazuhiro Nagata : The lack of Hsp47 causes accumulation of type I collagen in the endoplasmic reticulum and defect in extracellular fibril formation. 第 58 回日本細胞生物学会大会, さいたま市, 2005. 6. 14-17
- Yoshihito Ishida, Hiroshi Kubota, Akitugu Yamamoto, Lynn Y Sakai, Hans-peter Bachinger, Kazuhiro Nagata : Hsp47-null fibroblasts fail to form type I collagen fibrils due to improper folding and aggregation in the ER. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 10. 30-11. 3
- 石田義人, 久保田広志, 山本章嗣, Lynn Y Sakai, Hans-peter Bachinger, 永田和宏 : Hsp47 欠損繊維芽細胞における I 型コラーゲン繊維形成不全と凝集体形成. 第 10 回臨床ストレス蛋白質研究会, 熊本市, 2005. 11. 26
- Yoshihito Ishida, Hiroshi Kubota, Akitugu Yamamoto, Lynn Y. Sakai, Hans-peter Bachinger, Kazuhiro Nagata : Defect in extracellular fibril formation of type I collagen due to its improper folding in the ER of HSP47-knockout fibroblasts. 6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hawaii (USA), 2005. 11. 30-12. 5
- 石田義人, 久保田広志, 山本章嗣, Bachinger Hans-peter, Sakai Lynn Y, 永田和宏 : Hsp47 は小胞体における I 型コラーゲンの正しい三本鎖形成と凝集阻止に必須である. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2005. 12. 7-9
- Yoshihiro Ishikawa, Janice A.Vranka, Kazuhiro Nagata, Hans-Peter Bachinger : Functional analysis of the CXXXC motif in various proteins : Does this motif have protein disulfideisomerase activity? International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 10. 30-11. 3
- Motoko Naitoh, Hiroshi Kubota, Mika Ikeda, Shigehiko Suzuki, Kazuhiro Nagata : Chondro-astogenic gene expression and accumulation of tendon-like matrix in the human dermal disease, keloid. 6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hawaii (USA), 2005. 11. 30-12. 5
- 菊池唯史, 細川暢子, 永田和宏, 鈴木匡, 宮田敏行, 小亀浩市 : 小胞体膜蛋白質 Herp は PNGase と結合し, 小胞体関連分解基質の脱糖鎖を促進する. 第 78 回日本生化学会, 神戸市, 2005. 10. 19-22

- Tadashi Kikuchi, Nobuko Hosokawa, Kazuhiro Nagata, Tadashi Susuki, Toshiyuki Miyata, Koichi Kokame : Roles of Herp in endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 10. 30-11. 3
- Hirohito Ishikawa, Jun Hoseki, Noriko Nakagawa, Ryouji Masui, Seiki Kuramitsu : Functional analysis of the [4Fe-4S] cluster conserved among thermostable UDGs. 第 78 回日本生化学会, 神戸市, 2005. 10. 19-22
- Y. Atomi, T. Sakurai, A. Oguro, E. Ohto, Y. Fujita, T. Yamaguchi, H. Kubota, K. Nagata : Molecular chaperones essential for structural interactive dynamics of the cell and the environment and gravity. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 10. 30-11. 3

2) 講演・シンポジウム

- 永田和宏：分子シャペロンとタンパク質品質管理. 中部大学生物機能開発研究所シンポジウム, 春日井市, 2005. 2. 18
- 永田和宏：組織繊維化におけるコラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の役割と治療戦略. 第 125 回日本薬学会大会シンポジウム, 東京都, 2005. 3. 29
- 永田和宏：Productive Folding and Quality Control of Proteins. 理化学研究所・井川特別研究室シンポジウム (特別講演), 和光市, 2005. 4. 8
- 永田和宏：ストレスに対応する反応と細胞の危機管理. 第 82 回日本生理学会大会「若手の会」シンポジウム (基調講演), 仙台市, 2005. 5. 18
- Kazuhiro Nagata : Different mechanisms of the acceleration of ER-associated degradation by EDEM family proteins. EMBO-FEBS WORKSHOP on Biology of Molecular Chaperones, Zakopane (Poland), 2005. 5. 30
- Kazuhiro Nagata : Substrate recognition by HSP47, a collagen-specific molecular chaperone, as a member of serpin superfamily. SERPINS 2005 The 4th International Symposium on Serpin Structure, Function and Biology, Cairns (Australia), 2005. 6. 7
- 永田和宏：科学と文学の間. 第 4 回東北大学加齢医学研究所研究会同窓会・講演会 (特別講演), 仙台市, 2005. 6. 25
- Kazuhiro Nagata : Essential role of Collagen-Specific Molecular Chaperone HSP47. International Symposium on "Membrane Dynamics and Cell Regulation", 福岡市, 2005. 6. 29
- 永田和宏：小胞体関連分解：EDEM ファミリーからユビキチン化まで. 第 5 回日本蛋白質科学会年会シンポジウム, 福岡市, 2005. 7. 2
- 永田和宏：タンパク質品質管理. 新潟薬科大学 (特別講演), 新潟市, 2005. 7. 7
- 永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 と繊維化疾患. 第 1 回京都肝セルバイオロジー研究会 (特別講演), 京都市, 2005. 7. 16
- 永田和宏：糖鎖を認識する EDEM ファミリータンパク質による小胞体関連分解. 第 25 回日本糖質学会年会シンポジウム, 大津市, 2005. 7. 20
- 永田和宏：タンパク質の productive folding と品質管理. 第 17 回高遠・分子細胞生物学シンポジウム「細胞生物学のカットニングエッジ」(特別講演), 高遠町, 2005. 8. 18
- Kazuhiro Nagata : ER-associated degradation of misfolded proteins by EDEM and EDEM family proteins. Second International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, Tomar (Portugal), 2005. 9. 25
- 永田和宏：コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 による productive folding

- 秋田大学工学資源学部（特別講演），秋田市，2005. 10. 7
- Kazuhiro Nagata: ER stress and ER-Associated degradation of misfolded proteins. The 18th Naitoh Conference, Shonan (Japan), 2005. 10. 28
- Kazuhiro Nagata: Several components involved in ER-associated degradation of misfolded glycoproteins. International Symposium on Life of Proteins, Awaji (Japan), 2005. 11. 1
- Kazuhiro Nagata, Yoshihito Ishida, Hiroshi Kubota: Role of collagen-specific molecular chaperone HSP47 in the correct folding and fibril formation of procollagens; lessons from mice and cells disrupted with *hsp47* gene. 6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hawaii (USA), 2005. 12. 4
- 永田和宏：小胞体関連分野に関わるいくつかの因子．第 28 回日本分子生物学会年会シンポジウム「小胞体ストレスとタンパク質の品質管理」，福岡市，2005. 12. 7
- 永田和宏：細胞内タンパク質品質管理の分子機構．京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科研究セミナー，京都市，2005. 12. 14
- 細川暢子：小胞体の品質管理機構．第 7 回 GGA-HSP 勉強会特別講演，東京都，2005. 8. 27
- 久保田広志：細胞質シャペロン群の分子シャペロン機能．秋田大学工学資源学部（特別講演），秋田市，2005. 10. 7
- 菊池唯史，細川暢子，永田和宏，鈴木匡，宮田敏行，小亀浩市：小胞体膜蛋白質 Herp は PNGase と結合し，小胞体関連分解基質の脱糖鎖を促進する．第 78 回日本生化学会ワークショップ「小胞体の蛋白質品質管理」，神戸市，2005. 10. 19
- 久保田進，久保田広志，永田和宏：細胞質シャペロン CCT は疎水性 β シートを認識し凝集を抑制する：三量体 G タンパク質 β サブユニットを用いた解析．第 28 回日本分子生物学会年会ワークショップ「蛋白質のフォールディング／プロセッシングによる細胞機能調節とその破綻」，福岡市，2005.12.9

生体微細構造学分野 Department of Ultrastructural Research

講師 平芳 一法

Lect. Kazunori Hirayosi

【研究概要】

我々は生命現象の基本である転写の解析と，機能性核酸 RNA アプタマーの基礎と応用を中心に研究を展開している。

発生，分化を含む全ての生命現象は，転写によって制御されている。転写は，数々のシグナルが最終的に全ての遺伝子制御に共通な制御機構，基本転写機構に作用することで制御されている。裸の DNA を鋳型とする試験管内の解析が中心であった転写機構の解析も，クロマチン構造をとった DNA を鋳型とする解析へ，さらには核の構造と結びつけて考える段階に移行しつつある。生体内での反応をよりよく解析する方法として，機能性核酸 RNA アプタマーに注目し，研究に応用してきた。生きた細胞内での転写機構を解析する有効な方法がない現状で，我々の

研究は、細胞内の転写因子間の相互作用を *in vivo* で解析する新しい方法として期待されている。RNA アプタマーはあたかも抗体のごとく働き、生体内で標的とするタンパク質の機能を阻害することが可能である。多くの遺伝子の転写制御領域に存在する TATA 配列に結合する TBP (TATA Binding Protein) は、基本転写機構の核となる因子として知られており、我々の RNA アプタマーを用いた解析が、転写複合体中におけるこの因子の機能を明らかにしつつある。昨年来数種の TBP に特異的なアプタマーを取得し、試験管内の転写反応を阻害することを明らかにしたが、さらに特異性の高い新たなアプタマーの取得に成功した。TBP 分子には、種間を越えてよく保存された C 末端側の領域と保存されていない N 末端側領域に分けることができる。基本的な TBP の機能を発揮する C 末端側領域に比べ、N 末端側領域の機能は不明であった。新たなアプタマーを用いた解析は、N 末端側領域が TBP の転写制御領域への結合を制御する領域であり、その機能を明らかにする重要な手がかりを与えるものとなった。転写制御を考える上で、もう一つの重要な課題であるクロマチン構造による制御を解析するため、この構造を崩す因子として知られている GAGA factor に対するアプタマーを取得し、その機能を解析した。GAGA factor は機能的に主要な 3 つの部位を含む。そのうちの一つである POZ 領域に結合する 2 つのアプタマーは共に転写に影響を与えるが、遺伝子によってその影響が異なる事を明らかにした。GAGA factor はクロマチンの構造を崩すだけでなく、転写反応

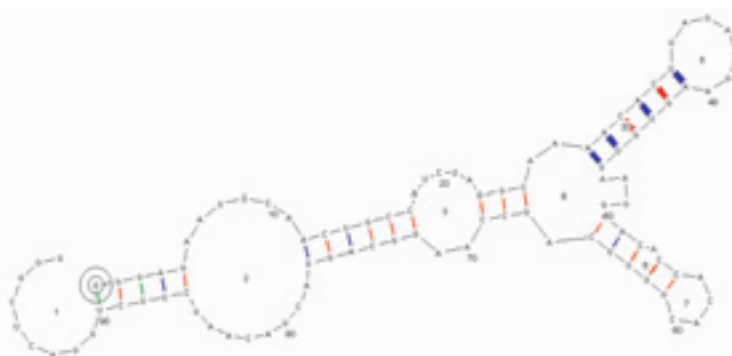


図 1：想定される RNA アプタマーの二次元構造
RNA アプタマーの構造をコンピューターでシミュレーションしたもの。

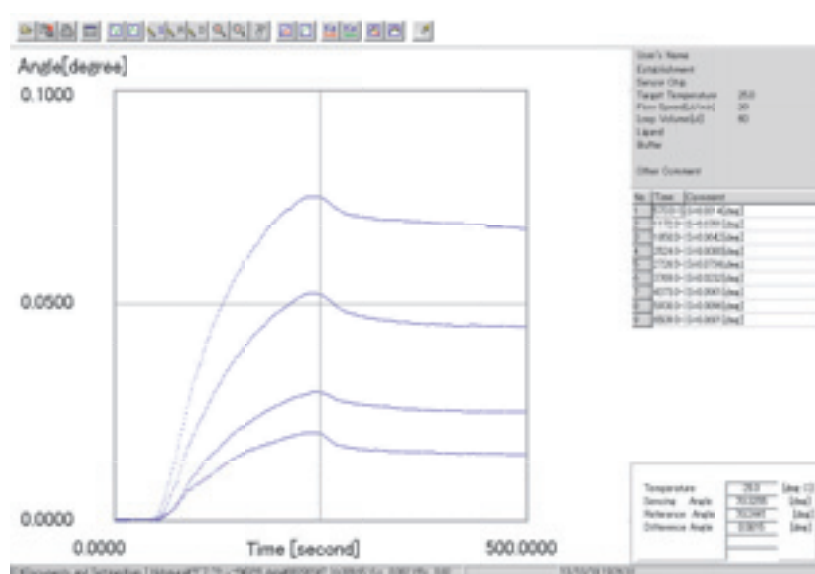


図 2：SPR を用いた TBP への RNA アプタマーの結合の解析

RNA アプタマーの濃度の増加に伴う結合量の増加が観察される。この結果から、RNA アプタマーの結合定数が 10^{-7} M と、結合力に富むことが明らかになった。

そのものを促進するか否かで議論が分かれているが、このアプタマーによる解析は GAGA factor が転写そのものを伸長過程で促進する事を示唆した。現在複合体中に含まれる因子の同定と構造学的な解析を行うため、共同研究でアプタマー存在下での結晶構造解析を行い、その結合部位の同定を進めている。

研究用ツールとして使用したアプタマーの有用性から、治療薬、検査用試薬への注目を集めつつあり、その実用面での本格的な応用を考え、取得方法の改良及び適した機械の開発、測定方法の改良を行っている。

Our laboratory is focusing our research on the analyses of basal transcription and the development of applications of RNA aptamer.

For the total understanding of *in vivo* transcription, we introduced RNA aptamers as a new analysis tool for dissecting architecture of transcription complex. Control over interactions between proteins in the complex is critical to *in vivo* study, but the required specificity may not be easily incorporated into small molecules that constitute the majority of drugs currently in use. Bio-macromolecule-derived reagents may be more suitable as antagonists in this situation, and RNA aptamers have become an especially promising choice. We isolated the sub-molecular specific RNA aptamers against a protein that constitutes a single structural domain, the Drosophila TATA-binding protein (TBP) and GAGA factor, a protein with multi functional domain. TBP is a critical molecule on the transcription of eukaryotic cells consist with well studied conserved C-terminal half and unidentified functional non-conserved N-terminal half. Our aptamer against TBP indicate the function of non-conserved N-terminal half of TBP as a regulator of binding to TATA element.

GAGA is well known as a chromatin remodeling factor, but the activity for accelerates the transcription is open to argument. Aptamers against GAGA factor suggest that GAGA factor could accelerate the transcription in the step of elongation. To clarify the binding manner of aptamer with TBP and GAGA factor, crystallographic study is going as collaboration research.

For expanding the application of RNA aptamer as a cure drug or examination reagent, we tried to identify the RNA aptamer against other proteins incorporated into disease development and developing new tool for effective selection of RNA aptamer.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Chiba Y, Yamashita Y, Ueno M, Fujisawa H, Hirayoshi K, Hohmura K, Tomimoto H, Akiguchi I, Satoh M, Shimada A, Hosokawa M Cultured murine dermal fibroblast-like cells from senescence-accelerated mice as *in vitro* models for higher oxidative stress due to mitochondrial alterations. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **60** : 1087-1098. (2005)
- Yamashita Y, Chiba Y, Xia C, Hirayoshi K, Satoh M, Saitoh Y, Shimada A, Nakamura E, Hosokawa M Different adaptive traits to cold exposure in young senescence-accelerated mice. *Biogerontology.* **6** : 133-139 (2005)
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会発表

法邑賢一・平芳一法：Involvements of GAGA factor in transcription analyzed by RNA aptamers 第78回日本生化学会大会(2005. 10. 19. ～22. 神戸)

平芳一法・法邑賢一：The analysis of intra-molecular regulation of TBP by RNA aptamer 第78回日本生化学会大会(2005. 10. 19. ～22. 神戸)

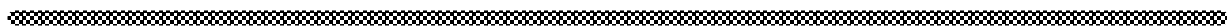
法邑賢一・平芳一法：転写過程における GAGA 因子複合体の機能—RNA アプタマーを用いた解析— 第28回日本分子生物学会年会(2005. 12. 7. ～10. 福岡)

平芳一法・法邑賢一：TBP 特異的 RNA アプタマーを用いた転写機構の解析 第28回日本分子生物学会年会(2005. 12. 7. ～10. 福岡)

2) 講演・シンポジウム

法邑賢一・平芳一法：Involvements of GAGA factor in transcription analyzed by RNA aptamers 第78回日本生化学会大会ワークショップ「転写 I」(2005. 10. 20. 神戸)

平芳一法・法邑賢一：The analysis of intra-molecular regulation of TBP by RNA aptamer 第78回日本生化学会大会ワークショップ「転写 I」(2005. 10. 20. 神戸)



生体機能調節学分野 Department of Experimental Pathology

分野主任 教授 坂口 志文
Prof. Shimon Sakaguchi

【研究概要】

(1) 免疫寛容の基礎的研究

正常な免疫系は、非自己抗原に対して免疫応答を示すが、正常自己構成成分に対しては応答しない。このような免疫自己寛容の基礎的メカニズム、およびその破綻としての自己免疫病の原因・発症機構を研究している。これまでに、制御性 T 細胞が自己反応性 T 細胞の制御に重要であり、その機能異常により自己免疫病が発症しうることを示した。現在、制御性 T 細胞の発生・分化機構、またその制御機構の分子の基盤を解析している。これまでに、転写因子 Foxp3 が、制御性 T 細胞の発生・分化のマスター制御分子であること、サイトカイン IL-2 が制御性 T 細胞の維持に不可欠であり、従って IL-2 レセプター (IL-2R) も制御性 T 細胞の必須分子であることを見出した。本年度、Foxp3 による IL-2, IL-2R 制御の分子機構に関して研究を進めた。

(2) 腫瘍免疫、移植免疫の基礎的研究

内在性制御性 T 細胞の増殖あるいは機能強化を図り、移植臓器の拒絶反応の抑制、免疫寛容の導入が可能か研究している。本年度、制御性 T 細胞に特異的に発現する機能分子を DNA マイクロアレイ、および、そのような細胞表面分子に対する単クローン抗体の作製を試みた。その結果、制御性 T 細胞は、Foxp3, IL-2, CD25, GITR など既知の分子をコードする遺伝子以外にいくつかの遺伝子を高発現しており、現在それぞれについて解析を進めている。また、いくつかの単クローン抗体は、制御性 T 細胞に特異性高く発現する分子に対するものであり、現在これらの抗体が認識する分子を解析、同定しようとしている。

(3) 新しい動物モデルを用いた慢性関節リウマチ(リウマチ様関節炎)の原因・発症機構の研究

免疫病理学的にヒトのリウマチ様関節炎と酷似する慢性関節炎を自然発症するマウスモデル (SKG マウス) を確立し、その原因・発症機構を解析している。この関節炎は、正常関節抗原を認識・攻撃する T 細胞による自己免疫性関節炎である。面白いことに、SKG マウスを SPF (specific pathogen-free) の環境で飼育すると、関節炎の発症頻度は有意に低下する。SPF 環境下で関節炎が発症する条件を解析し、自然免疫系の抗原非特異的活性化が重要であるとの結果を得た。その分子の基盤を解析し、例えば β -glucan は、そのレセプター Dectin-1 を介して樹状細胞、大食細胞を活性化し、SKG マウスに関節炎を惹起でき、抗 Dectin-1 抗体は、この関節炎誘導をブロックできるとの結果を得た。この研究は、自己免疫病の発症における環境因子の作用機構のひとつを明らかにしたものである。

This department studies : (i) the cellular and molecular basis of immunologic self-tolerance and the etio-pathology of autoimmune disease ; (ii) the strategy for eliciting effective immune responses to autologous tumor cells, or inducing immunologic tolerance to organ transplants, by manipulating the mechanism of immunologic self-tolerance ; and (iii) the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis.

One aspect of immunologic self-tolerance (i. e., immunological unresponsiveness of the normal immune system to normal self-constituents) is maintained by a T cell-mediated dominant control of self-reactive T cells. We showed that

elimination of a T-cell subpopulation expressing CD25, which constitutes 5-10% of the peripheral CD4⁺ T cells and less than 1% of CD8⁺ T cells in normal individuals, elicits various autoimmune diseases immunopathologically similar to human counterparts (e. g., insulin-dependent diabetes mellitus, autoimmune thyroiditis, and autoimmune gastritis with pernicious anemia). We have shown that the transcription factor Foxp3 is a master regulator of the development and function of the naturally arising CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. We have also shown that CD25, which is the IL-2 receptor α -chain, is not only a specific marker for the regulatory T cells, but also an indispensable cytokine for their survival in the periphery.

This year, we have attempted to understand the molecular basis of the suppression exerted by natural regulatory T cells. DNA micro-array analysis have revealed several genes that are specifically up-regulated in activated regulatory T cells. We also prepared several monoclonal antibodies specific for the molecules expressed by natural regulatory T cells. We have characterized these genes and molecules and attempted to exploit them for induction of transplantation tolerance and provoking effective tumor immunity by manipulating regulatory T cells.

We are also investigating the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis (RA) by analyzing a mouse model (called SKG mice) established in our department. SKG mice, which have a mutation of the gene encoding ZAP-70, a T cell-specific signaling molecule, spontaneously develop arthritis in a conventional environment, but not in a microbially clean environment. This year, we have investigated the molecular basis on which environmental microbial agents trigger arthritis in this model. We have shown that zymosan, a crude extract of yeast, or purified β -glucans, such as curdaran or laminarin, are able to elicit arthritis in SKG mice in our specific pathogen-free environment. In addition, blockade of Dectin-1, a receptor for β -glucans, can inhibit the development of arthritis. The results indicate that stimulation of innate immunity can elicit T cell-mediated autoimmune arthritis if autoimmune arthritogenic T cells have been produced as a result of a genetic anomaly or variation and persist in the periphery. A similar mechanism may operate in RA in humans.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Sakaguchi, S. : Naturally arising *Foxp3*-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol.* 6 : 345-352, 2005.
- Ko, K., Yamazaki, S., Nakamura, K., Nishioka, T., Hirota, K., Yamaguchi, T., Shimizu, J., Nomura, T., Chiba, T., and Sakaguchi, S. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2005 202 : 885-891.
- Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. : Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization *J. Exp. Med.* 201 : 723-735, 2005.
- Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Brown, G., Tagami, T., Sakihama, T., Nomura, T., Akira, S., Gordon, S., Nakamura, T., and Sakaguchi, S. Environmental stimulation of innate immunity triggers chronic arthritis in mice genetically prone to produce arthritogenic autoimmune T cells : a key role of fungal β -glucans and their receptor Dectin-1. *J. Exp. Med.* 201 : 949-960, 2005.

- Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., Saito, K., Ikeda, H., Kuribayashi, K., Allen, P. M., Schreiber, R. D., Sakaguchi, S., Old, L. J., Shiku, H. Definition of target antigens for naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201 : 681-686, 2005.
- Bach, J. F., and Sakaguchi, S. Autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 17 : 567-569, 2005.
- Sakaguchi, S., and Sakaguchi, N. : Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 17 : 589-594, 2005.
- Nagahama, K., Nishimura, E., and Sakaguchi, S. Induction of tolerance by adoptive transfer of regulatory T cells. In "Immunological Tolerance : Methods and Protocols". Ed. Paul J. Fairchild. Humana Press. In press.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Hata, H., Takahashi, T., and Nomura, T. Spontaneous development of autoimmune arthritis due to genetic anomaly of T cell signal transduction. *Seminars in Immunology*. In press.
- Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Seminar in Cancer Biology* 16 : 115-123 (2006).
- Yoshizawa, A., Ito, A., Li, Y., Koshiba, T., Sakaguchi, S., Wood, K. J., and Tanaka, K. The roles of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in operational tolerance after living donor liver transplantation. *Transplant. Proc.* 37 : 37-39, 2005.
- Sakaguchi, S., Takahashi, T., Hata, H., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Hirota, K., Nomura, T., and Sakaguchi, N. SKG mice, a monogenic model of autoimmune arthritis due to altered signal transduction in T cells. *Progress in Inflammation Research*. In press.
- Sakaguchi, S., Setoguchi, R., Yagi, H., and Nomura, T. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* In press.
- Chai, J-G., Xue, S., Coe, D., Addey, C., Bartok, I., Scott, D., Simpson, E., Stauss, H. J., Hori, S., Sakaguchi, S., and Dyson, J. P. Regulatory T cells, derived from naive CD4⁺CD25⁻T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. *Transplantation.* 79 : 1310-1316, 2005.
- Quezada SA, Bennett K, Blazar BR, Rudensky AY, Sakaguchi S, Noelle RJ : Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance : the interplay of clonal anergy and immune regulation. *J. Immunol.* 175 : 771-779, 2005.
- Sakaguchi, S., and Sakaguchi, N. : History of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. In Regulatory T cells in inflammation, *Progress in Inflammation Research*. Eds. L. S. Taams, A. N. Akbar, and M. H. M. Wauben, Birkhaeuser Verlag, Basel, p3-17, 2005.
- Nomura, T., and Sakaguchi, S. : Regulatory T cells in tumor immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 293 : 287-302, 2005.
- Sakaguchi, S. Preface : Regulatory T cells in autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* 24 : 157-158, 2005.
- Sakaguchi, S., and Sakaguchi, N. : Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune diseases. *Int. Rev. Immunol.* 24 : 211-226, 2005.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi S. CD4⁺ regulatory cells as a potential immunotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360 : 1647-1661, 2005.
- Fehervari, Z. and Sakaguchi, S. : T lymphocytes : Regulatory. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. In press.
- Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T., Sakaguchi, S., Ueno, T., Takahama, Y., Uchida, D., Sun, S., Kajiura, F., Mouri, Y., Han, H., Matsushima, A.,

- Yamada, G., and Matsumoto, M. Development of Autoimmunity against Transcriptionally Unrepressed Target Antigen in the Thymus of Aire-Deficient Mice. *J. Immunol.* 174 : 1862-1870, 2005.
- Matsubara, Y., Hori, T., Morita, R., Sakaguchi, S., and Uchiyama, T. Phenotypic and functional relationship between adult T cell leukemia and regulatory T cells. *Leukemia* 19 : 482-483, 2005.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S. Regulatory T cells. In "Measuring Immunity" eds. M. T. Lotze and A. W. Thompson, Elsevier. p322-335, 2005.
- Gondek, D. C., Lu, L.-F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S., and Noelle, R. J. Cutting Edge : Contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 174 : 1783-1786, 2005.

2) 総 説

- 坂口教子, 坂口志文 : ZAP-70 と関節炎 Medical Science Digest 2005 Vol. 31 No. 10 (5-6)
- 坂口教子, 坂口志文 : ZAP-70 による T 細胞選択偏移と関節リウマチ Annual Review 免疫 2005 (1-7)
- 坂口教子, 坂口志文 : ZAP-70 遺伝子変異による自己免疫性関節炎の発症 免疫 2005 Molecular Medicine Vol. 41 臨時増刊号 (312-319)
- 吉富啓之, 坂口志文 : SKG マウス 日本臨床 2005 63 巻増刊号 1 関節リウマチ (40-45)
- 野村尚史・坂口志文 : FoxP3 と CD25⁺CD4⁺ 内在性制御性 T 細胞 Molecular Medicine 2005 Vol. 42 N0. 4 (432-442)
- 瀬戸口留可・坂口志文 : 内在性制御性 T 細胞と自己免疫疾患 医学のあゆみ 2005 Vol. 213 No. 1 (69-73)
- 野村尚史 坂口教子 坂口志文 : SKG マウス関節炎における炎症性サイトカインの役割 炎症と免疫 2005 Vol.13 no.4 (97-104)
- 野村尚史・坂口志文 : 自己に対する免疫寛容 わかりやすい免疫疾患 日本医師会雑誌 Vol134特別号 (1) (s40-42)
- 野村尚史・坂口志文 : CD25⁺CD4⁺T_R 細胞 Surgery Frontier Vol.12 No. 3 2005. 9 (69-72)
- 坂口教子, 坂口志文 RA の新しい動物モデル—SKG マウスについて リウマチ膠原病 最新トピックス2005 (47-48)
- 田中聡, 坂口志文 制御性 T 細胞による免疫関連疾患の治療の可能性 炎症と免疫 vol. 13 no. 6 2005. (744-749)
- 瀬戸口留可・坂口志文 : 内在性制御性 T 細胞とサイトカイン 実験医学 増刊 2005 Vol. 23 No. 20 (84-88)
- 田中聡, 坂口志文 新しいリウマチモデルとしての SKG マウス—単一遺伝子突然変異が生む自己免疫性関節炎 Annual Review 2006 免疫 224-230

◆ 学会等の講演 ◆

1) 学会・研究会発表

- 廣田圭司 : CD25⁺CD4⁺T cells 制御性 T 細胞に対する新規モノクローナル抗体の作製と移植免疫, 腫瘍免疫への応用 第二回 COE 若手研究者発表会 (2005. 1. 7.)
- 小野昌弘 : GITR^{high}T 細胞の除去による致死的自己免疫性心筋炎および多臓器の自己免疫病の誘導 第 1 回免疫コロキウム (2005. 2. 21-22 兵庫)
- Keiji Hirota, Hiroyuki Yoshitomi, Satoshi Tanaka, Takashi Nomura, Noriko Sakaguchi and Shimon Sakaguchi : Generation of autoaggressive CD4⁺ T cells due to a ZAP-70 point mutation in SKG mice that spontaneous develop

autoimmune arthritis. Keystone Symposia Cellular Senescence and Cell Death (2005 3. 3-8. Colorado, USA)

Ruka Setoguchi, Shohei Hori, Takeshi Takahashi and Shimon Sakaguchi : IL-2 and autoimmunity : homeostatic maintenance of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells via IL-2 secreted by other T cells and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. Keystone Symposia Cellular Senescence and Cell Death (2005 3. 3-8. Colorado, USA)

Tomoyuki Yamaguchi, Takeshi Takahashi and Shimon Sakaguchi : Separation of natural CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells from activated T cells by a novel specific monoclonal antibody : Application to tumor immunology. Keystone Symposia Basic Aspect of Tumor Immunology (2005 3. 19-23. Colorado, USA)

山口智之：葉酸受容体を介する制御性 T 細胞の機能操作 第五回 COE 若手研究者発表会 (2005. 12. 1.)

山口智之, 坂口志文：葉酸受容体を標的とする CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の分子的制御 第 35 回日本免疫学会総会 (2005. 12. 13-15 横浜)

田中聡, 橋本求, 廣田圭司, 吉富啓之, 野村尚史, 坂口教子, 坂口志文：CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞による SKG マウス関節炎の治療 第 35 回日本免疫学会総会 (2005. 12. 13-15 横浜)

廣田圭司, 吉富啓之, 橋本求, 田中聡, 野村尚史, 坂口教子, 坂口志文：自己免疫性関節炎を自然発症する SKG マウスにおける CD4⁺T 細胞の自己反応性 第 35 回日本免疫学会総会 (2005. 12. 13-15 横浜)

橋本求, 吉富啓之, 田中聡, 廣田圭司, 野村尚史, 坂口教子, 三森経世, 坂口志文：関節炎を自然発症する SKG マウスにおける抗シトルリン化蛋白抗体産生の検討 第 35 回日本免疫学会総会 (2005. 12. 13-15 横浜)

久保香織, 西岡朋尚, 増永太郎, 田村康一, 坂口志文：GITR-GITRL 経路遮断による制御性 T 細胞の移植片生着延長効果維持増強 第 35 回日本免疫学会総会 (2005. 12. 13-15 横浜)

2) 講演・シンポジウム

坂口志文：自己免疫性関節炎発症における遺伝, 環境因子—動物モデルの解析から 第 4 回リウマチ性疾患研究会 (2005. 1. 15 東京)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫制御 第 1 回大阪大学 COE 大学院セミナー (2005. 1. 18 大阪)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫制御 福井大学医学部大学院セミナー (2005. 1. 24 福井)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答の制御 第 1 回免疫コロキウム (2005. 2. 21-22 兵庫)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答の制御 第 17 回日本神経免疫学会学術集会 (2005. 3. 3-4 福岡)

Shimon Sakaguchi : Induction of Tumor Immunity by Depleting Naturally Occurring Foxp3-Expressing CD25⁺CD4⁺ Regulatory T Cells or Attenuating their Suppressive Activity. Keystone Symposia Basic Aspect of Tumor Immunology (2005 3. 19-23. Colorado, USA)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫制御：自己免疫、腫瘍免疫を中心に 第 4 回 Skin Science Seminar (2005. 4. 1 兵庫)

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by naturally occurring Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T Cells International Symposium Immune Tolerance and Regulation (2005 4. 7. Kyoto, Japan)

Shimon Sakaguchi : Development of autoimmune arthritis due to a mutation of the ZAP-70 gene : T cell selection shift and altered Treg function The 4th International Workshop of Kyoto T cell conference (2005 4. 8-10. Kyoto, Japan)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答の制御 科学技術振興機構 2005 第 1 回基礎研究報告会 (2005. 4. 15 大阪)

坂口教子：ZAP-70 遺伝子変異による関節リウマチモデルマウス 第 49 回日本リウマチ学会総会学術集会 (2005. 4.

17-20 横浜)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答の制御 第 104 回日本皮膚科学会総会学術集会 (2005. 4. 22-24 横浜)

Shimon Sakaguchi : Genetic Determinants of Lymphocyte Function in RA. FOCiS 2005 ANNUAL MEETING (2005 5. 12-16. Boston , USA)

Shimon Sakaguchi : Naturally Arising CD25⁺CD4⁺ Regulatory T Cells in Immunologic Tolerance. FOCiS 2005 ANNUAL MEETING (2005 5. 12-16. Boston , USA)

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by naturally occurring Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T Cells Mechanisms of Immune Responses in Health and Diseases RCAI-JST International Symposium on Immunology 2005 (2005 6. 17-19. Yokohama, Japan)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫制御 日本免疫学会免疫サマースクール 2005 (2005. 7. 24-27 千葉)

坂口志文：自己免疫性関節炎自然発症マウス：自己免疫病の遺伝因子，環境因子について 第 2 回日本病理学会カンファレンス 2005 (2005. 7. 29-30 愛媛)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答の制御 平成 17 年度第 2 回産学情報交流会 (2005. 8. 19 京都)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫制御：自己免疫，腫瘍免疫，移植免疫の共通基盤について 第 11 回阪神造血器腫瘍研究会学術集会 (2005. 9. 2 大阪)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T cells in Immunological diseases. 6th Meeting of the JSI and DGfI (2005 9. 17-20. Potsdam, Germany)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T-cells in Immunological Tolerance to Self and No-self. Geneva University (2005 5. 21. Geneva , Switzerland)

Shimon Sakaguchi : REGULATORY T CELLS. 8th Meeting of the Immunology of Diabetes Society (2005 10. 6-9. 淡路島)

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by naturally occurring Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T Cells. International Symposium : Autoimmunity in Intractable Diseases : From Bench to Clinic (2005. 10. 25-27. Hakone, Japan)

野村尚史：CD25⁺CD4⁺制御性T細胞による免疫制御とその応用 第14回南近畿血液病フォーラム (2005. 10. 22. 大阪)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T-cells. 2005 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting (2005 11. 13-17. San Diego , USA)

坂口志文：抑制性 T 細胞と自己免疫疾患 九州大学臨床免疫セミナー (2005. 12. 6 福岡)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答の制御 第 28 回日本分子生物学会 (2005. 12. 7-10 福岡)

Shimon Sakaguchi : Contribution of thymic selection and peripheral regulation to immunologic self-tolerance. 第 35 回日本免疫学会総会 (2005. 12.13-15 横浜)

(受賞)

武田医学賞

高峰記念三共賞



生体システム制御学分野 Department of Medical Systems Control

分野主任 教授 長澤 丘司

Prof. Takashi Nagasawa

【研究概要】

1. ケモカイン CXCL12 と造血における血球の時間空間的制御

成体の骨髄において、B リンパ球の前駆細胞は、造血幹細胞からいくつかの多能性（複数の種類の血球を生み出す）前駆細胞を経て生み出され、最も初期の pre-pro-B 細胞から、pro-B 細胞、pre-B 細胞の順に分化が進み、B リンパ球を形成すると考えられている。現在、一次リンパ臓器での B リンパ球の形成に必須であることが明らかになっているサイトカインは、IL-7 と、ケモカインファミリーに属する CXCL12 のみで、私たちは CXCL12 が、最も早期の分化段階 pre-pro-B 細胞より作用することを示している (Nagasawa T et al. *Nature* (1996) ; Tachibana K et al. *Nature* (1998) ; Egawa T et al. *Immunity* (2001), 文献 4)。ケモカインとは、保存された構造で定義されたサイトカインのファミリーで、その多くは強い細胞遊走誘導活性を有する。昨年、私たちは、CXCL12 を高発現する細胞 (CXCL12 高発現細胞) が、骨髄の細網細胞 (ストローマ細胞) の一部であり、pre-pro-B と、最終分化した抗体産生細胞である形質細胞を中心に B リンパ球形成のニッチ細胞 (ニッチとは臓器内で造血に必須の分子を供給する特別な微小環境) として機能していることを示唆し、より未分化な多能性前駆細胞も CXCL12 高発現細胞の突起に接着しており、CXCL12 高発現細胞は、造血幹細胞のニッチでもある可能性を提示した (Tokoyoda T et al. *Immunity* (2004), 文献 4)。これまで私たちは、CXCL12 高発現細胞が、胎児の骨髄では、血管周囲に局在し、造血幹細胞のホーミング (細胞が臓器に移動、定着すること) のニッチである可能性を示しており (Ara T et al. *Immunity* (2003))、現在、CXCL12 の成体骨髄の造血幹細胞における役割、CXCL12 高発現細胞が幹細胞ニッチである可能性について検討している。

2. ケモカイン CXCL12 と運動ニューロンの方向特異的な軸索伸長

CXCL12 は、これまで、血液系以外の発生現象に必須の役割を果たすことが示されている。最近、ニューヨーク大学の T. Jessell らは、私たちとの共同研究で、神経形成に関して興味深い知見を見出した (文献 2)。中枢神経系の形成において、神経細胞 (ニューロン) の前駆細胞は脳内をダイナミックに移動し、その移動は、放射状方向と接線方向に大別される。これまで CXCL12 は、接線方向に移動する小脳の顆粒細胞、海馬の顆粒細胞前駆細胞や大脳の介在ニューロンの適切な経路での移動を制御していることが知られていた。一方、神経系形成において、神経細胞から突出する軸索の伸長経路を制御するサイトカインは、ネトリンやセマフォリンなど数多く知られているが、その伸長開始を制御する分子は不明であった。今回、後脳の運動ニューロンの腹側への方向特異的な軸索伸長の開始に CXCL12 が重要な役割を果たすことが見出された (文献 2)。今後、神経系と免疫系に共通する CXCL12 の作用機構の解明が期待される。

3. ケモカイン CXCL12 と臓器特異的な血管形成

私たちは、以前、CXCL12 欠損マウスと CXCR4 欠損マウス胎児の血管系を解析し、これらの遺伝子欠損マウスでは、大動脈、大静脈などの全身の主要大血管に著明な異常は認められなかったが、胎児の胃腸管に分布する大型

の血管の形成に異常が認められることを見出し、血管形成においてサイトカインによる臓器特異的な制御をはじめて明らかにした (Tachibana K et al. *Nature* (1998))。腸管が成体と同様に形成されている胎生 17.5 日頃の野生型マウスでは、腸間膜の中を上腸間膜動静脈よりの太い分枝が扇の骨のように走行し、長い腸管に均等な間隔で到達するが、このような血管が CXCL12 欠損マウスと CXCR4 欠損マウスでは、認められなかった。

最近、私たちは、この消化管の血管の形成における CXCL12 の作用機構を解析するために、小腸に分布する太い血管 (空腸動静脈や回腸動静脈) に焦点を絞り、その形成機構を検討した (文献 1)。腸管に分布する血管形成機構は、これまでほとんど報告されていなかった。そこで、共焦点顕微鏡を用いて、胎生 9 日より経時的に腸間膜内の血管を観察した。腸管壁の小血管は、局所で形成されると考えられており、胎生 9.5 日頃すでに原始血管叢として観察された。次に、腸管が、中腸ループを形成する胎生 10 日頃、腸間膜の中央を上腸間膜動脈が走っているが、上腸間膜動脈は、中腸およびその血管叢と隣接していた。野生型マウスでは、翌胎生 11.5 日に、隣接する上腸間膜動脈と腸管壁の原始血管叢の間に短い結合血管が多数認められ、胎生 12~12.5 日目には、腸間膜が広くなり、上腸間膜動脈と腸管および腸管壁の原始血管叢とが離れてゆくが、これに伴い、上腸間膜動脈と原始血管叢との結合血管が伸長していた。CXCL12 欠損マウスおよび CXCR4 欠損マウスにおいては、胎生 11.5 日頃より、この上腸間膜動脈と腸管壁の原始血管叢との結合血管がほとんど認められなかった。野生型では、この結合血管が形成されると考えられる胎生 11.5 日頃、上腸間膜動脈血管内皮細胞からフィロポディア (突起) が認められたが欠損マウスでは全く認められず、CXCL12 の作用点は、上腸間膜動脈血管内皮細胞からのフィロポディア形成である可能性がある。一方、腸間膜の静脈系は、胎生 12 日頃、動脈系を挟むように外側に血管網として観察されたが、この血管網の形成は、野生型マウスと欠損マウスとの間でほとんど差が認められなかった。胎生期の腸間膜における CXCR4 の発現は、欠損マウスの表現型と同様に、動脈特異的で、胎生 10.5 日頃までは、野生型、CXCL12 欠損マウスにおいて上腸間膜動脈に発現が認められたが、胎生 11.5 日では CXCL12 欠損マウスでのみ、その発現がほとんど消失していた。以上より、腸を栄養する血管の形成においては、隣接する大型の動脈と原始血管叢が結合した後、結合血管が伸長するという、臓器特異的な血管形成機構が存在し、CXCL12 は、上腸間膜動脈の血管内皮細胞に作用し、その受容体である CXCR4 の発現を維持し、隣接する大型の動脈と原始血管叢を結合させることにより、この臓器特異的な血管形成を支持していることが示唆された。以上の知見より、小腸を栄養する空腸動静脈や回腸動静脈の臓器特異的な形成機構の一端が示された。臓器特異的な血管形成は、がんをはじめとする様々な病態の形成に重要であり、CXCL12 の制御は、これらの疾患の治療に応用できる可能性も考えられる。

1. Roles of the chemokine CXCL12 in lymphohematopoiesis

Chemokines are a family of small structurally related molecules that were recognized originally for their ability to regulate cell trafficking in inflammation. We isolated a chemokine, CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor/pre-B-cell growth stimulating factor (CXCL12/SDF-1/PBSF) as a molecule that stimulates the growth of B lymphocyte precursors (Nagasawa T et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2305-2309 (1994)) and have found its multiple physiological functions in development. We have shown that CXCL12 is essential for embryonic viability, development of B lymphocyte, colonization of bone marrow by hematopoietic cells and cardiogenesis (Nagasawa T et al. *Nature* (1996)). Moreover, we have revealed that a primary physiologic receptor for CXCL12 is a seven-transmembrane G-protein-coupled receptor CXCR4 that also functions as a coreceptor for strains of HIV-1 (Nagasawa et al. *Nature* 382, 635-638 (1996) ; Tachibana et al. *Nature* 393, 591-594 (1998) ; Egawa et al. *Immunity* 15, 323-334 (2001)).

Stem cells and/or progenitor cells migrate and colonize during development. We found that CXCL12 plays a criti-

cal role in colonization of bone marrow by hematopoietic stem cells (HSCs) (Ara et al. *Immunity* 19, 257-267 (2003)) and is involved in murine primordial germ cells (PGCs) development likely by controlling colonization of the gonads by PGCs (Ara et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 5319-5323 (2003)), revealing the key roles of CXCL12 in mobilization of hematopoietic cells between organs during ontogeny.

In adult bone marrow, we have found that a small population of stromal cells which has high levels of CXCL12 expression (termed CXCL12^{hi} reticular cells) have several processes, are scattered throughout bone marrow and located some distance from the cells expressing interleukin (IL)-7. Multipotent hematopoietic progenitors and pre-pro-B cells are attached to the processes of CXCL12^{hi} reticular cells. Maturer pro-B cells, which require IL-7, have moved away. Furthermore, the end-stage B cells, plasma cells again seed CXCL12^{hi} reticular cells. Thus, we have identified stage-specific niches for B lymphopoiesis, demonstrated the B lymphocyte characteristic location in specific niches within bone marrow during development and suggested that CXCL12 maintains the precursors in the niche (Tokoyoda et al. *Immunity* 20, 707-718 (2004), **ref. 4**). We are studying the role of CXCL12 in hematopoietic stem cells in adult bone marrow and their interaction with CXCL12^{hi} reticular cells.

2. Roles of CXCL12 in blood vessel formation

We have found that CXCL12 and CXCR4 chemokine ligand receptor system is also required for vascularization of the gastrointestinal tract, that defined a new signalling system for organ vascularization during embryogenesis (Tachibana et al. *Nature* 393, 591-594 (1998)). However, the mechanism by which CXCL12/CXCR4 functions in blood vessel formation had remained elusive. Recently, we have found a novel mode of organ vascularization and determined the roles of CXCL12 in these processes (**ref. 1**). In the developing small intestine, many short interconnecting vessels form between larger superior mesenteric artery (SMA) and the neighboring primary capillary plexus surrounding the primitive gut and they elongate and become the arteries supplying the small intestine. Mice lacking CXCL12 or CXCR4 lack the interconnecting vessels but have normal venous networks. The mutants lack filopodial extension and intussusception from endothelial cells of SMA seen in wild-type embryos. CXCR4 is specifically expressed in arteries in the developing mesenteries and its expression is severely reduced in CXCL12^{-/-} embryos. Mice in which CXCR4 is specifically deleted in the endothelium reveal vascular defects identical to those observed in the conventional CXCR4^{-/-} embryos. Together, CXCL12 acts on arterial endothelial cells of SMA to up-regulate CXCR4 and mediate the connection between the larger artery and neighboring capillary plexus in an organ-specific manner (**ref. 1**).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

<原著論文>

1. Ara, T., Tokoyoda, K., Okamoto, R., Koni, P.A., and Nagasawa, T. : The role of CXCL12 in the organ-specific process of artery formation. : *Blood* 105 : 3155-3161 (2005)
2. Lieberam, I., Agalliu, D., Nagasawa, T., Ericson, J., Jessell, T.M. : A CXCL12-CXCR4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of Mammalian motor axons. : *Neuron* 47 : 667-679 (2005)
3. Foudi, A., Jarrier, P., Zhang, Y., Wittner, M., Geay, J.F., Lecluse, Y., Nagasawa, T., Vainchenker, W., Louache, F. :

Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4^{-/-} chimeric mice. : **Blood** : (in press)

4. Nagasawa, T. : Microenvironmental niches in the bone marrow for B-cell development. : **Nature Rev. Immunol.** (in press)

<和文総説>

長澤丘司：CXCL12(SDF-1)による造血制御. 実験医学 23, 102-109 (2005)

長澤丘司：骨髄における造血を制御するケモカイン CXCL12 と細胞性ニッチ. 細胞工学 24, 686-692 (2005)

長澤丘司：ジェネラルレビュー：サイトカインとケモカイン：2006 年. Molecular Medicine 臨時増刊号 42, 256-262 (2005)

長澤丘司：ケモカイン CXCL12 (SDF-1/PBSF) とそのレセプター CXCR4 は，消化管の血管形成にどのようにかわるのか？ 分子消化器病 vol. 2 no. 3, 33-40 (2005)

長澤丘司：サイトカイン，ケモカイン. 遺伝子医学 MOOK 1 再生医療へのブレイクスルー その革新技術と今後の方向性, 60-67 (2005)

◆ 学会等の発表 ◆

<学会発表>

三上栄，杉山立樹，小原洋志，千葉勉，長澤丘司：CXCL12 による成熟顆粒球の動態制御と CXCL12 発現細胞：第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005. 12. 13-15. 横浜)

<招待講演>

Nagasawa, T. : CXCL12 and regulation of HSC and B lymphocyte behavior during development : Gordon Research Conference on Immunochemistry and Immunobiology (2005. 8. 7-12. Oxford, United Kingdom)

Nagasawa, T. : The role of a Chemokine CXCL12 in blood vessel formation and hematopoiesis. : The 4th Aso International Meeting (AIM) (2005. 5. 19-21. Kumamoto, Japan)

長澤丘司：微小環境による血管形成の制御とケモカイン CXCL12 (SDF-1/PBSF)：第 37 回日本結合組織学会 (2005. 5. 26-27. 富山)

長澤丘司：骨髄微小環境による血球，リンパ球形成の制御とケモカイン CXCL12 (SDF-1/PBSF)：第 70 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 (2005. 7. 21-22. 京都)

生体組織工学研究部門

生体分子設計学分野 Department of Cellular Differentiation

分野主任 教授 開 祐司

Prof. Yuji Hiraki

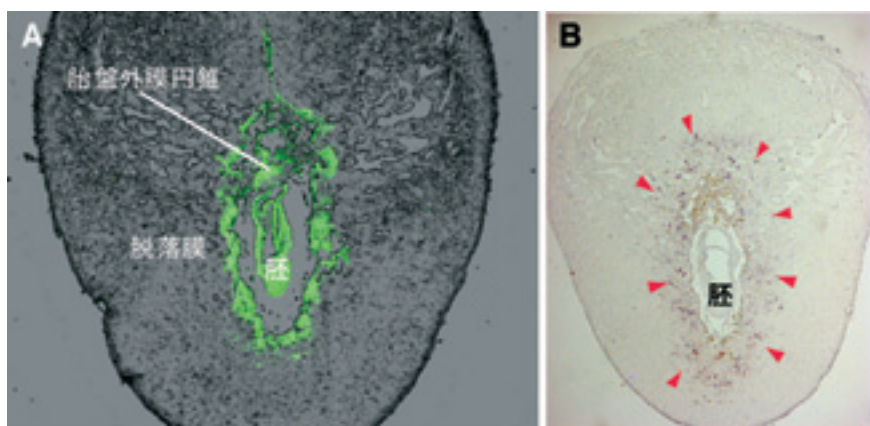
【研究概要】

本研究分野では、組織血管化、軟骨・腱・靭帯形成とその再生修復の分子機構の解明を主たるテーマとして、動物モデル、細胞培養系を駆使して分子レベルでの解析を行っている。現在の研究テーマは、以下の通りである。

1. Chondromodulin-I に関する研究

(1) 脱落膜における Chondromodulin-I の発現とその機能解析

我々は、軟骨が無血管であることに着目して、ウシ胎仔骨端軟骨から血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) を精製・クローニングした。ChM-I は無血管軟骨をはじめとして、胸腺、網膜に発現するが、最近になって妊娠マウスの母体-胎仔境界である脱落膜において、着床胚 (図 A および B) を取囲むように一過性の発現が見られることが明らかになった (図 B)。脱落膜は胚着床の刺激により子宮内膜ストロマ細胞が形質転換したものであり、浸潤性を持つ胚由来栄養膜細胞に対する物理的・化学的透過障壁を形成することが知られている。そこで、未分化栄養膜細胞を含むマウス胎盤外膜円錐と COS7 細胞の共培養により *in vitro* において栄養膜細胞の浸潤を評価する系を構築した。これを用いて ChM-I の効果を検討したところ、ChM-I が栄養膜細胞の浸潤を負に制御する作用を持つことが明らかとなった。現在 ChM-I を、血管新生を含めた組織変化の制御因子と考え、その作用機序を分子レベルで検討している。



妊娠マウス 7.5 日目の母体-胎仔境界における ChM-I の発現パターン
♂EGFP トランスジェニックマウスと♀野生型マウスを交配することにより、胎仔由来の細胞 (緑色) が母体組織である脱落膜に浸潤する様子を示した (図 A)。ChM-I の発現は胎仔由来の細胞 (栄養膜細胞) を取囲む成熟な脱落膜において見られる (図 B; 矢頭)。

(2) Chondromodulin-I の代謝に関する研究

ChM-I は 334 アミノ酸からなる膜貫通型前駆物質の C 末端部分であり、furin 認識切断部位 RERR でのプロセッシングと糖鎖修飾を受けることにより成熟型 (120 アミノ酸残基, 分子量約 25 kDa) として細胞外に分泌さ

れる。一方、軟骨組織中には成熟型以外にも、その限定分解産物と考えられる short form ChM-I (分子量約 14 kDa) が検出される。また ChM-I が、軟骨無血管領域に高発現する一方で血管侵入を受ける肥大化/石灰化軟骨層では消失すること、ここで高発現する MMP-13 の基質となりうることも明らかとなった。これらの結果は、ChM-I の作用が、細胞外分泌後のプロセッシングや分解除去という過程を経て、巧みに制御される可能性を示唆している。現在、このような ChM-I の代謝制御機構とその生理的意義について解析を進めている。

2. 軟骨分化制御の分子機構に関する研究

内軟骨性骨形成過程では、未分化間葉細胞から凝集過程を経て分化した軟骨細胞は、分化成熟を遂げて肥大化し、周囲の基質は石灰化する。我々は、このような軟骨の多段階分化過程を、前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いて *in vitro* で再現することができる培養系を構築した。平成 16 年度から引き続いて、独立行政法人日本学術振興会の日独共同研究プロジェクトとして、ドイツの GSF Research Center for Environment and Health の Institute of Developmental Genetics と共同で、軟骨の多段階分化過程におけるトランスクリプトーム解析を行っている。これまでに、ATDC5 細胞の未分化期 (day 2)、成熟軟骨細胞期 (day 21)、肥大化・石灰化軟骨細胞期 (day 42) の Long SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) ライブラリーを構築し、各ライブラリーからおおよそ 5 万タグの遺伝子発現情報を得ている。現在、これらのライブラリーにおいて、差次的に発現する遺伝子群の軟骨性骨原基での発現パターンを解析している。

3. 腱・靱帯特異的な転写制御領域の解析

腱・靱帯は、栄養血管が極めて乏しいため、外傷などの瞬間的な外力によって一旦損傷すると、機能的、生体力学的に十分に再生させることは極めて困難である。これらの組織の機能障害は関節症などとも密接に関連しており、運動器の組織再生の重要な標的となっている。しかしながら、これまで、腱・靱帯細胞を特徴付ける特異的分子マーカーが知られていなかったため、その分化誘導機構の解析はほとんどなされていなかった。一方、我々が ChM-I 関連遺伝子として同定した TeM (Tenomodulin) は、腱・靱帯を含む強靱結合組織の分化に伴って発現が誘導される II 型膜貫通蛋白質である。そこで、TeM の腱・靱帯特異的な転写制御機構を解析することによって、腱・靱帯細胞の分化を制御するメカニズムを明らかにする研究を開始した。これまでに、初代トランスジェニックマウス胚を用いて、TeM 遺伝子の転写開始点上流 -10Kb から +4Kb までのゲノム DNA 断片に、腱・靱帯に特異的な転写制御活性があることを見いだしている。

4. 関節軟骨の修復に関する研究

血管に富み旺盛な再生能力をもつ骨組織とは逆に、関節軟骨は極めて再生能力に乏しい。関節軟骨が損傷を受けると容易に変形性関節炎へ移行し、硝子軟骨で再生させることは極めて困難である。関節軟骨全層欠損-修復モデルは、軟骨初期分化を解析する有効な *in vivo* モデルで、軟骨再生に必要な細胞増殖・分化制御の解明に寄与すると考えられる。そこで、本研究室ではこれを用いて、軟骨再生の機構を解析している。すなわち、我々は Fibroblast growth factor-2 が骨髄由来間葉細胞の増殖と遊走を刺激して関節軟骨の再生修復に対して促進的に作用することを明らかにした。さらに、副甲状腺ホルモン受容体シグナルの活性化が関節軟骨の再生誘導に阻害的に作用すること、副甲状腺ホルモン受容体を発現する増殖性の間葉系細胞が軟骨欠損部位に集積することが関節軟骨の再生修復に不可欠であることなどを明らかにした。これら増殖分化因子とその応答性の解析から骨髄幹細胞システムの活性化による軟骨再生の基盤技術を開発している。

The proper growth and differentiation signaling from the surrounding extracellular environment regulates tissue formation and its functions. We are aiming at the elucidation of molecular interactions and signaling networks underlying

ing mesenchymal vascularization or cartilage, bone and tendon/ligament formation. Our current research efforts are focused on the following studies.

1. Functional analysis of Chondromodulin-I

(1) Expression of Chondromodulin-I during decidualization and its function in tissue remodeling

We have previously purified and cloned Chondromodulin-I (ChM-I) as an angiogenesis inhibitor from fetal bovine cartilage based on the inhibitory activity of endothelial cell growth. ChM-I is abundantly expressed in the avascular zone of cartilaginous molds, and also expressed in thymus and eye. Recently, we found that ChM-I was transiently expressed at the feto-maternal interface, decidua, and its expression was detected only in the mature decidua surrounding the implanting mouse embryo. It is known that ovarian hormones stimulate differentiation of endometrial stromal cells into decidual cells that form the physical and chemical barriers to fetal invasive trophoblasts. To evaluate the effect of ChM-I on the invasive trophoblasts, we established an *in vitro* trophoblast invasion system using ectoplacental cone containing trophoblast precursors, co-cultured on COS7 cell layer. In this system, ChM-I exogenously expressed in COS7 cells suppressed the trophoblasts invasion, suggesting that ChM-I functions as a negative regulator of trophoblast invasion. We are now investigating the molecular mechanism of the inhibitory activity of ChM-I toward trophoblast invasion.

(2) Metabolism of Chondromodulin-I

ChM-I is a 25-kDa glycoprotein that is secreted from chondrocytes after post-translational modification and cleavage from the transmembrane precursor protein at the site (RERR) for endoproteases like furin. In spite of abundant expression in the avascular zone of the cartilaginous molds, ChM-I is not detected in late hypertrophic/calcifying cartilage invaded by blood vessels. Recently, we found that a short form of ChM-I (M. W. ca. 14-kDa) was present in cartilage extracts. Among matrix metalloproteinases tested, only MMP-13 cleaved glycosylated human recombinant ChM-I. Thus, ChM-I could be a novel substrate for MMP-13 that is expressed in hypertrophic/calcified cartilage. We are currently analyzing the molecular mechanism of ChM-I metabolism in cartilage.

2. Molecular mechanism of chondrogenic differentiation

During endochondral bone formation, undifferentiated mesenchymal cells condense to form the cartilaginous bone mold. In the developing cartilaginous mold, chondrocytes rapidly proliferate to synthesize a large amount of extracellular matrices such as type II collagen and aggrecan and mature to become hypertrophic. Then extracellular matrices around hypertrophic chondrocytes calcify. Subsequently, vascular invasion occurs and calcified cartilage is gradually replaced by bone. We previously established the *in vitro* model of chondrogenic differentiation by using mouse embryonal carcinoma cell line ATDC5, which is currently used as one of the standard chondrogenic cell lines in the field of cartilage and bone mineral research. We have started the joint research project supported by JSPS (Japan Society for the Promotion of Science) in collaboration with Institute of Developmental Genetics (GSF-National Research Center for Environment and Health, Germany) for identification and functional analysis of genes that control chondrogenic differentiation during endochondral bone formation, taking advantage of ATDC5 cells. We constructed three long SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) libraries from undifferentiated ATDC5 cells at day 2, mature ATDC5 cells at day 21, and hypertrophic/calcified ATDC5 cells at day 42. We have analyzed ~50,000 tags from each library to identify genes differentially expressed during chondrogenic differentiation.

3. Identification of tendon and ligament specific enhancer

Once injured, recovering the functions of tendons and ligaments is quite difficult due to their hypovascular properties. Functional disorder of tendon/ligament often causes severe joint disease. Therefore these tissues are thought to be important targets in the field of regenerative medicine. However, very little is known about the molecular mechanisms of tendon/ligament formation mostly owing to the absence of specific differentiation markers. We cloned a type II transmembrane protein *TeM* (*tenomodulin*) as a *ChM-I* related gene and found that *TeM* is predominantly expressed in dense connective tissues such as tendons and ligaments. Expression of *TeM* is associated with appearance and maturation of tendon fibroblasts. To reveal the molecular mechanisms controlling tendon and ligament formation, we are currently analyzing the transcriptional regulation for the mouse *TeM* gene. We found that the genomic fragment between -10Kb and +4Kb of the mouse *TeM* gene could drive specific LacZ expression in tendons and ligaments in founder transgenic mice.

4. Regenerative repair of articular cartilage

In contrast to bone, articular cartilage has a very limited capacity for repair. Cartilaginous lesion easily causes osteoarthritis. Therefore articular cartilage has been a target tissue in regenerative medicine. Full-thickness defects that penetrate articular cartilage undergo repair processes that result in the generation of either fibrous tissue or hyaline cartilage depending on the defect size. Undifferentiated mesenchymal cells participate in these repair processes. Taking advantage of this tissue-repair system as a model, we are studying the regulation of growth and differentiation of chondrogenic cells *in vivo*: Fibroblast growth factor-2 effectively stimulates both the mobilization and migration of replicating mesenchymal cells, thus functioning in support of a chondrogenic repair response. We demonstrated that parathyroid hormone (PTH)/PTH related-protein (PTHrP) signaling was inhibitory on the induction of chondrogenic repair of articular cartilage. The accumulation of PTH/PTHrP receptor-positive proliferating mesenchymal cells in the defect cavities critically correlated with the subsequent induction of cartilage regeneration, which can be a prognostic marker of repair.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Kusafuka, K., Nakano, K., Hiraki, Y., Shukunami, C., Nagatsuka, H., Nagai, N., Takemura, T., Sakaguchi, Y., Okazaki, K., Kusafuka, M., Hisha, H., Ikehara, S.: Expression and localization of cartilage-specific matrix protein chondromodulin-I mRNA in salivary pleomorphic adenomas. *Virchows Arch.* **446**: 34-40 (2005)

Hiraki, Y., Shukunami, C.: Angiogenesis Inhibitors Localized in Hypovascular Mesenchymal Tissues: Chondromodulin-I and Tenomodulin. *Connect. Tissue Res.* **46**: 3-11 (2005) (Invited Review Article)

Shukunami, C., Oshima, Y., Hiraki, Y.: Chondromodulin-I and tenomodulin: a new class of tissue-specific angiogenesis inhibitors found in hypovascular connective tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**: 299-307 (2005) (Invited Review article)

2) 著書および総説

開祐司: 161 血管形成制御因子. 「予防医学事典」(編集, 松島綱治, 酒井敏行, 石川昌, 稲寺秀邦), 朝倉書店 (東

京) 364-366(2005)

宿南知佐, 開祐司:《特集「血管形成の分子メカニズム 発生・がん・再生プログラムから多角的に解き明かす」》
無血管組織における負の血管形成制御,「実験医学」**23**(16):2450-2455(2005)

開祐司:軟骨形成における細胞間相互作用,「福岡医学雑誌」(Fukuoka Acta Medica)**96**(10):353-362(2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Masuhara, H., Hosokawa, Y., Sugiyama, T., Asahi, T., Hiraki, Y.: Manipulation and Chemical Modification of Single Bio-cells by Femtosecond Laser Induced Shockwave. Photonics West 2005 (2005.1.22-27. San Jose)

西崎有利子, 泉真一郎, 宿南知佐, 古谷一清木誠, 桃井章裕, 北川 章, 近藤寿人, 開 祐司:ゼブラフィッシュにおける Chondromodulin-II の発現解析, 第 52 回マトリックス研究会 (2005.3.19-20, 大分)

梶 貴博, 細川陽一郎, 森 肇, 開 祐司, 増原 宏:多角体のパターンニングとパターン上での細胞増殖制御 (Patterning of individual polyhedra and regulation of cell proliferation), 第 52 回応用物理学関係連合講演会 (2005.3.29-4.1, 埼玉)

多田拓司, 細川陽一郎, 朝日 剛, 宿南知佐, 開 祐司, 増原 宏:集光フェムト秒レーザーによる細胞内構造の局所破壊と全反射蛍光顕微鏡によるそのイメージング, 第52回応用物理学関係連合講演会 (2005.3.29-4.1, 埼玉)

滝本 晶, 角花美和, 開 祐司, 渋谷正史, 宿南知佐:ニワトリ胚芽における可溶性 Flt-1 強制発現による血管形成阻害とその骨格形成への影響, 日本発生生物学会第 38 回大会 (2005.6.1-4, 仙台)

泉真一郎, 西崎有利子, 宿南知佐, 古谷一清木誠, 桃井章裕, 北川 章, 近藤寿人, 開 祐司:ゼブラフィッシュにおける chondromodulin2 の発現解析, 日本発生生物学会第 38 回大会 (2005.6.1-4, 仙台)

西崎有利子, 角花美和, 山田秀一, 開 祐司, 宿南知佐:Tenomodulin の強靱結合組織特異的な発現制御領域の解析, 日本発生生物学会第 38 回大会 (2005.6.1-4, 仙台)

宿南知佐:Tenomodulin の強靱結合組織特異的な発現, 成人病の原因・病態の解明に関する研究会 (2005.7.9-10, 軽井沢)

梶 貴博, 細川陽一郎, 開 祐司, 増原 宏:集光フェムト秒レーザーを利用した培養細胞のマイクロパターンニング (Micropatterning of cultured cells utilizing femtosecond laser ablation of liquid culture medium), 2005 年秋季 第 66 回応用物理学会 (2005.9.7-11, 徳島)

Hosokawa, Y., Tada, T., Asahi, T., Masuhara, H., Shukunami, C., Hiraki, Y.: Local deformation and regeneration processes of single animal cell by focused femtosecond laser beam. The 8th International Conference on Laser Ablation (2005.9.11-16, Banff)

Takimoto, A., Oro, M., Hiraki, Y., Shukunami, C.: Tenomodulin, a marker for tenocytes, is positively regulated by the basic helix-loop-helix transcription factor, Scleraxis. 6th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium (2005.11.30-12.5, Hawaii)

三浦重徳, 宿南知佐, 開 祐司:母体-胎仔境界における Chondromodulin-I の発現と栄養膜細胞浸潤に対する作用 (Expression of Chondromodulin-I at Feto-maternal Interface and Its Function in the Trophoblast Invasion), 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005.12.7-10, 福岡)

西崎有利子, 小路美和, 三浦重徳, 山田秀一, 開 祐司, 宿南知佐: Tenomodulin 遺伝子の強靱結合組織特異的なエンハンサーの同定 (Identification of dense connective tissue specific enhancer of the mouse tenomodulin gene), 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005. 12. 7-10, 福岡)

野津裕之, 宿南知佐, 古山明子, 森 肇, 開 祐司: FGF2 固相化多角体を用いた細胞の増殖誘導・分化制御への応用 (Application of FGF2-immobilized Polyhedron to regulation of cell proliferation and cytodifferentiation), 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005. 12. 7-10, 福岡)

2) 講演・シンポジウム

多田拓司, 細川陽一郎, 朝日 剛, 宿南知佐, 開 祐司, 増原 宏: 集光フェムト秒レーザーによる細胞内構造の局所破壊と全反射蛍光顕微鏡によるそのイメージング, 特定領域研究「分子系の極微構造反応の計測とダイナミクス」第 2 回公開シンポジウム (2005. 2. 2-3, 大阪)

Shukunami, C.: Expression and regulation of the tenomodulin gene during Tenogenesis/ligamentogenesis. Max-Planck-Institute for Biochemistry (2005. 3. 18 Munich)

宿南知佐: テノモジュリンと腱・靱帯形成, 第 37 回日本結合組織学会学術大会シンポジウム 1 「マトリックス制御と形態形成・分化」(2005. 5. 26-27, 富山)

開 祐司: 軟骨細胞の分化と再生, 第 6 回運動器科学研究会特別講演 (2005. 8. 27-8, 静岡)

開 祐司: 軟骨由来血管新生抑制因子と骨・軟骨代謝, 第 14 回京都骨代謝研究会特別講演 2 (2005. 11. 10, 京都)

開 祐司: 再生医学の時代における生と死, The Ryukoku University Project in Pure Land Buddhism and the Natural Sciences (John Templeton 財団の後援による) 公開シンポジウム “Views of Life and Death in Buddhism and the Natural Sciences” 「仏教と自然科学における生命観」(2005. 11. 17, 京都)

生体材料学分野 Department of Biomaterials

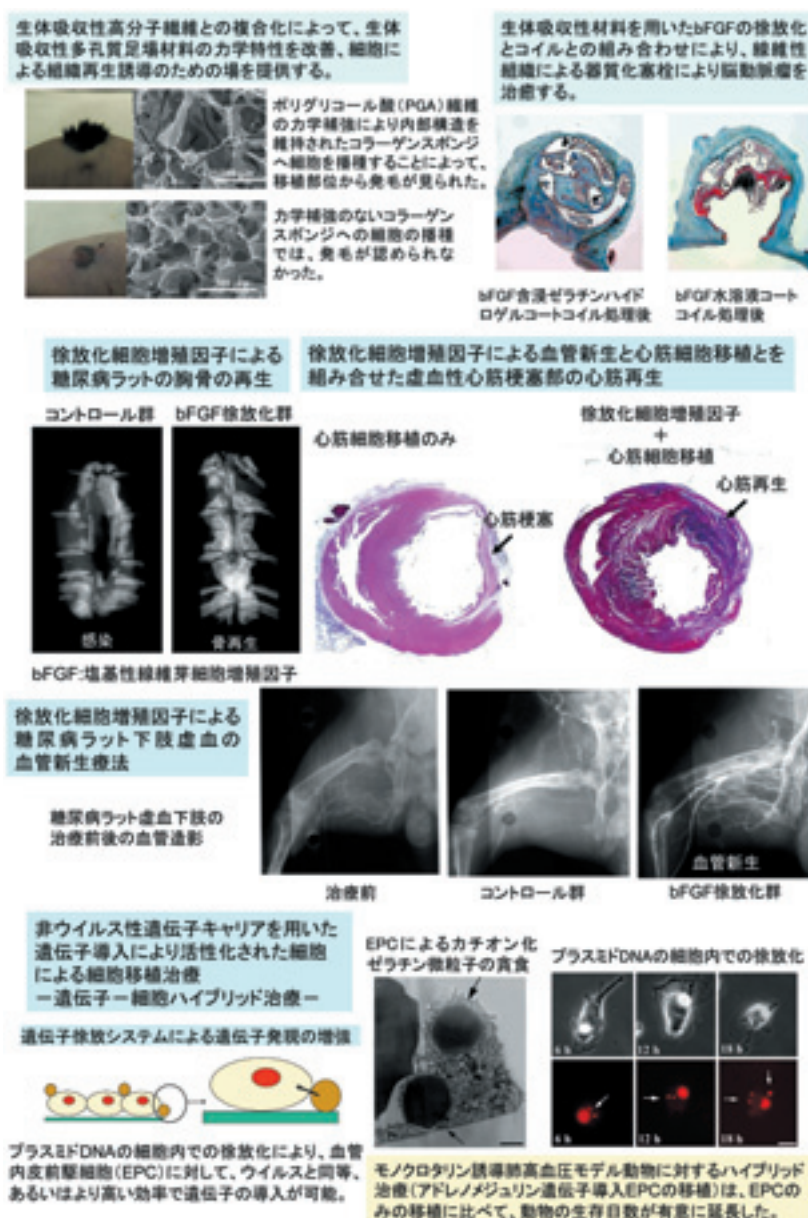
分野主任 教授 田畑 泰彦
Prof. Yasuhiko Tabata

【研究概要】

本研究分野の目的は、医療に应用可能あるいは基礎生物医学研究に役立つ方法、手段、および技術を材料科学の立場に立って研究開発していくことである。生体材料とは、体の中で使用したり、あるいはタンパク質、細胞などの生体成分と直接に接触する状況で用いられる材料のことであり、本研究分野においては、高分子、金属、セラミックス、およびそれらのコンポジットからなる生体材料のデザインと創製を行い、得られた生体材料の基礎生物医学および医療への応用を目指している。具体的には、生体組織・臓器の再生誘導治療（一般的には、再生医療と呼ばれる）および再建外科治療のための生体材料、あるいは薬物・遺伝子治療、予防ワクチン、および診断効率の向上を目指したドラッグデリバリーシステム (DDS) のための生体材料の研究開発を行っている。加えて、幹細胞の分子生物学、生化学、細胞生物学の研究、および細胞培養のために必要不可欠な生体材料についての研究開発も進め

ている。

再建外科治療をアシストする生体材料の生体適合性はまだまだ低く、その代行できる機能も単一であることから、患者に高い Quality of Life (QOL) を与えることが困難である場合が多い。また、臓器移植もドナー不足に加えて、免疫拒絶抑制剤の副作用にともなう問題もある。このように、再建外科と臓器移植との現在の2大先端外科治療に限界が見えてきている状況の中で生まれてきたのが、細胞を活用、生体本来のもつ生体組織の再生誘導能力を基盤として病気を治療しようという試みである。この再生医療(=再生誘導治療)の試みが医療応用できるようになれば、再建外科と臓器移植治療に続く第3の治療法となることは疑いない。この再生医療は生体材料に依存しない点、免疫抑制剤を必要としない点で前2者とは大きく異なる。再生医療の目的は、細胞を利用した生体組織の再生誘導と臓器機能の代替による病気の治療である。この実現には、再生現象にかかわる増殖・分化ポテンシャルの高い幹細胞の生物医学研究が必要であることはいままでの間もないが、それに加えて、細胞に生体組織の再生を誘導するための環境(場)を与えることが不可欠である。この生体組織(Tissue)の再生誘導の場を構築するための医工学(Engineering)的な技術・方法論が生体組織工学(Tissue Engineering)である。生体組織工学の基本アイデアは、生体組



組織の構成成分である細胞、細胞の増殖・分化のための足場、および細胞増殖因子をうまく組み合わせることで、生体組織の再生誘導を実現することである。このためには生体材料の利用が必要不可欠であり、特に、生体内で分解吸収され消失する材料（生体吸収性材料）と3つの要素とを組み合わせ、生体組織の再生を誘導する。この再生誘導に適切な生体吸収性を金属やセラミックスにもたせることは難しく、この観点から、生体組織工学では主として高分子材料が利用されている。生体吸収性材料の利点は、材料の生体内での役割が果たされた後にその場から消失するため、再び取り出す必要がなく、また、材料の存在が生体組織・臓器の再生を妨げないことである。生体材料が生体組織の再生修復とともに吸収されれば、材料に対する問題となる生体反応の心配もなく、また、細胞を患者自身から採取することができれば、免疫拒絶反応もなく、理想的な治療法となる。DDS（ドラッグデリバリーシステム、薬物送達法）および生物医学研究のための材料にも生体吸収性が要求される場合が多い。

本研究分野では、生体吸収性の高分子材料を中心とした生体組織・臓器の再生誘導療法（再生医療）のための生体材料、薬物、遺伝子治療、予防、診断、などに必要なDDSのための生体材料、分子生物学、生化学、細胞生物学、細胞培養、および幹細胞研究のための生体材料、あるいは外科および内科治療補助のための生体材料の研究を行っている。以下にその内容をより詳しく述べる。

1) 生体組織の再生誘導治療のための生体材料

血液細胞以外のほとんどの細胞は、生体内では細胞外マトリックスと呼ばれる増殖・分化のための足場材料に接着して存在、その生物機能を発現している。そのため、生体組織が大きく欠損した場合には、この足場も失われるため、欠損部に細胞のみを補うだけでは組織の再生誘導の望めない場合が多い。そこで、再生誘導を期待する部位に細胞の増殖・分化のための仮の足場を与える必要がある。本研究分野では、この細胞の足場としての3次元あるいは多孔質構造をもつ生体吸収性の成形体（人工細胞外マトリックス）をデザイン、創製している。しかしながら、いかに足場が優れていても、細胞の数が少なかったり、細胞を増殖させるための生体シグナル物質が足りなければ、生体組織の再生誘導は望めないであろう。このような場合、細胞の増殖・分化を促す細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を用いるのが1つの現実的な解決法である。しかしながら、これらの生体シグナル物質は生体内での寿命が短く不安定であるため、その利用には投与上の工夫が必要である。この工夫がDDSである。たとえば、生体吸収性材料に細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を包含させ、再生部位で徐々に放出（徐放）する。この徐放化技術によって、生体物質の生物活性が効率よく発揮され、その結果として、種々の生体組織・臓器の再生誘導が促進されることがわかってきている。現在、細胞増殖因子の徐放化による血管、骨の再生誘導治療の臨床研究が始まっている。本研究分野では、この徐放化担体のための生体材料をデザイン、創製している。一般に、慢性疾患では病的部位は線維性組織で占められ、臓器機能が不全に陥っていることが多い。そこで、薬物、遺伝子を用いて、線維性組織を消化分解できれば、周辺の正常組織の再生誘導能によって病的部位は再生修復され、慢性線維性疾患の内科的な再生誘導治療が実現できる。本研究分野では、このアイデアを基に病的部位への薬物・遺伝子のターゲティングおよび局所徐放化による内科的再生誘導治療を行っている。

2) 幹細胞工学および基礎生物医学研究のための生体材料

再生医療には、2つの方向性がある。1つは前述の生体組織工学をベースとした生体組織の再生誘導治療である。もう1つが、増殖・分化ポテンシャルの高い細胞を利用した細胞治療である。後者のためには、臨床応用可能な細胞を調製することが重要となる。本研究分野では、この細胞移植治療に不可欠である幹細胞、前駆細胞、および芽細胞などを効率よく得ることを目的として、それらの細胞の単離、増殖、分化のための培養基材および培養技術について研究開発を行っている。従来の細胞培養法に加えて、種々の生体材料からなる培養基材あるいは培養装置（バイオリアクタ）の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している。これらの一連の研究は、単に再生医療の

ために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけでなく、広く、細胞の増殖・分化、形態形成に関する生物医学の基礎研究にも応用できる生体材料、技術、方法論を提供する。加えて、細胞機能の解析および細胞の遺伝子改変を目的として、遺伝子導入、発現のための非ウィルスキヤリアの研究開発も行っている。幹細胞を利用した細胞移植治療では、時として、細胞の再生誘導能力不足が問題となる場合がある。これを解決する1つの方法として、遺伝子導入による幹細胞の活性化（遺伝子による機能改変）が有望である。これまでに、ウィルスペクターを用いた遺伝子導入が行われているが、ウィルスを用いていることから、その臨床応用はきわめて難しい。そこで、非ウィルスキヤリアを用いた幹細胞の活性化法の開発が望まれている。例えば、遺伝子を幹細胞内で徐放化する技術を研究開発した。この技術を利用することによって、ウィルスと同程度あるいはそれよりも高いレベルの遺伝子発現が実現できた。さらに、遺伝子により活性化した幹細胞を用いることによって、より高い細胞移植治療効果が認められた。また、遺伝子と非ウィルスキヤリアとが固定化された基材上で細胞を培養、さらにバイオリアクタを組み合わせることによって、細胞への遺伝子導入発現効率を高める技術も開発している。これらの一連の技術は、細胞の機能改変に利用可能であり、その対象となる物質は遺伝子だけでなく、small interfering RNA (siRNA) などの核酸物質、低分子、ペプチド、タンパク質などの細胞内導入法としても有効である。

3) DDSのための生体材料

薬物が効くのは、薬物がその作用部位に適切に作用するからである。しかしながら、現実には、薬物は部位選択性がなく、その薬理作用を発現させるために大量投与が行われている。これが薬物の副作用の主な原因である。そこで、薬物を必要な部位へ、必要な濃度で、必要な時期にだけ働かせるための試みが行われている。これがDDSであり、その目的は薬物の徐放化、薬物の長寿命化、薬物の吸収促進、および薬物のターゲティングなどである。いずれの目的にも、薬物を修飾するための生体材料が必要である。本研究分野では、生体材料学の観点からの薬物、遺伝子治療のためのDDS研究を行っている。加えて、全身あるいは局所、粘膜ワクチン、核磁気共鳴イメージング(MRI)、超音波診断などに対しても、その予防ワクチンおよび診断効果を高めるためにはDDS的工夫が不可欠であり、予防および診断医学に対するDDSの研究開発も行っている。また、可溶化、安定化などのDDS技術、方法論の化粧品、ヘルスケア領域への展開も進めている。

4) 外科・内科治療アシストのための生体材料

本研究分野は、高分子材料を医療に応用していくという、本研究所の前身である生体医療工学研究センターの材料科学研究の流れを引いている。その中で、生体内で吸収する性質をもつ高分子材料を中心として、外科・内科治療の補助のための生体材料の研究開発を行っている。

上記の研究内容について、材料科学的な観点から、基礎および応用研究を行っている。得られた研究成果を基に、様々な生体組織、臓器（皮膚、骨、心臓冠動脈、脂肪、軟骨、神経、歯周組織、毛髪、心筋、腎臓など）の再生、あるいはDDS技術、方法論を用いた薬物治療、予防、診断などについて、医学部、歯学部、獣医学部、企業との共同研究を通じた、応用研究を展開している。加えて、得られた材料や技術の生物医学の基礎研究への応用についても共同研究を通して検討を進めている。

The main objective of our department is to investigate and develop methods, procedures, and technologies which are applicable to basic and clinical medicines as well as basic biology on the basis of material sciences. The materials to use in the body and to contact biological substances, like proteins and cells, are defined as biomaterials. In our department, various types of biodegradable and non-biodegradable biomaterials of polymers metals, ceramics, and their composites, are designed and created aiming at their clinical applications and the development of experimental tools for ba-

basic researches of medicine and biology which scientifically support clinical medicine. We are investigating biomaterials to assist reconstructive surgery and to apply to drug delivery systems (DDS) for improved therapeutic efficacy. However, it is often difficult for patients to improve their Quality of Life (QOL) only by the therapeutic procedure of reconstructive surgery because the biomaterials used are of poor biocompatibility and functional substitution. For organ transplantation, there are several problems to be resolved, such as the lack of donor tissue and organ or the reverse effects of immunosuppressive agents. The two present medicines of up-to-date are clinically limited in terms of the therapeutic procedure and potential. Under such circumstance, one therapeutic approach newly emerging is the therapy of regenerative medicine. The objective is to treat diseases by regenerating injured or lost tissues and substituting organ functions by making use of cells. The regenerative medical therapy is quite different from the reconstructive surgery and organ transplantation from the viewpoint of no use of biomaterials and medical devices and no need of immunosuppressive agents, respectively. The basic idea of regenerative therapy is to give cells an environment site suitable to induce the regeneration of tissue and organ. It is tissue engineering that is a biomedical technology or methodology to create this environment of regeneration induction. Generally, there are three factors necessary for tissue regeneration induction, such as cells, the scaffold for cell proliferation and differentiation, and biological signal molecules of growth factors and the related gene, which are fundamentally 3 components constituting the body tissue. For successful regenerative therapy of tissue and organ, it is indispensable to efficiently take advantage of various biomaterials for recombination of all the factors. Especially, biodegradable biomaterials play an important role in this medical applications. Since there are few metals and ceramics with biodegradable nature, polymer materials of biodegradability have been mainly used for this purpose. If a biomaterial is degraded to disappear in the body, it is not always necessary to retrieve the material from the body after of the function expected accomplishment. In addition, the material should be degraded at the right time profile not to allow to physically impair the physical process of natural tissue regeneration by the material remaining. Thus, biodegradable biomaterials are indispensable for the research and development (R&D) of regenerative medical therapy, DDS or basic biology and medicine.

Our research goal is to design and create biomaterials mainly from polymers which are practically applicable for regenerative medical therapy, stem cell technology, DDS, and medical therapy of reconstructive surgery and internal medicine. More detailed explanation about every project is described.

1) Biomaterials for the Therapy of Regenerative Medicine

It is well recognized that cells are present in the living tissue adhering onto the natural scaffold for the proliferation and differentiation of cells or their morphogenesis, namely extracellular matrix (ECM). When the body tissue is largely lost, the ECM itself also disappears. In such a case, we cannot always expect the tissue regeneration at the large defect only by supplying cells to the defect. One of the possible ways to achieve successful tissue regeneration is to provide a temporary scaffold for the proliferation and differentiation of cells to the defect. We are designing and creating 3-dimensional and porous constructs of biodegradability as this temporary cell scaffold which is an artificial ECM. However, even if a superior scaffold is supplied to the tissue defect, the tissue regeneration will not be achieved without sufficient number of cells and the amount of cell proliferation cue signals. It is one of the practically possible ways to use growth factors for promoted proliferation and differentiation of cells. It is, however, necessary for in vivo use of growth factors to contrive their administration form because of the in vivo short half-life and instability. One possible way to break through the problem is to use the controlled release of growth factor or the related gene at the tissue site

to be regenerated over an extended time period by incorporating the factor or gene into an appropriate carrier. This release technology enables the growth factor to efficiently exert the biological activity, resulting in promoted tissue regeneration. We are designing and preparing the release carrier from biodegradable biomaterials. Generally, in the chronic fibrotic disease, the damaged portion of organ is often occupied with the fibrous tissue, which causes organ dysfunction. It is highly possible that if the fibrosis is enzymatically digested by a proper way, the fibrotic site is naturally regenerated based on the inherent regenerative potential of the surrounding normal tissue and consequently the organ function is regeneration recovered. We are designing and preparing a system of drug targeting and the local release with polymers of an organ affinity to achieve the regeneration-induced therapy for chronic disease based on the natural regeneration potential of patients (physical regenerative therapy of internal medicine). This is a therapeutic approach different from the conventional regenerative therapy of surgery where cells, the scaffold, and signal molecules or the combinations are surgically applied to a tissue defect for regeneration induction thereat. The basic idea of regenerative therapy will be combined with internal medical therapy to open a new therapeutic field in the future. In addition, a new cell culture technology is being developed to enhance the expression level of nucleic acid compounds, such as decoy DNA and small interfering RNA (siRNA), for cells with non-viral gene carriers.

2) Biomaterials for Stem Cells Technology and Basic Researches of Medicine and Biology

There are two approaches to realize regeneration medical therapy. One is tissue engineering described above. The other is cell therapy to induce tissue regeneration. For the latter approach, it is of prime importance to efficiently obtain and prepare cells with a high potential of proliferation and differentiation, such as stem cells, precursors, and blastic cells. In this department, the technology and methodology of cell culture with various biomaterials have been explored to efficiently isolate, proliferate, and differentiate stem cells, precursors, and blastic cells. A series of this study not only aims at the preparation of cells suitable for the therapy of regenerative medicine, but also research and development (R&D) of materials, technologies, and methodologies for basic medicine and biology. In addition, non-viral for vectors for plasmid DNA and siRNA have been investigated to design the DDS system for gene transfection which can biologically analyze the functions of stem cells and genetically engineer cells to activate the biological functions for cell therapy. For example, we have developed a new system for the controlled release of plasmid DNA inside cells and succeeded in enhancing the level of gene transfection and the consequent gene expression as high as or higher than that of viral vector system. In addition, cell culturing on a plasmid DNA-coated substrate by a bioreactor system enhanced the level of gene expression as well as prolonged the expressed period. This reverse transfection system has been developed while it can be applied for cell internalization of low-molecular weight compounds, peptides, proteins, and nucleic acids (siRNA and decoy DNA).

3) Biomaterials for DDS

Generally there are few drugs which have a specific selectivity for the site of action. Therefore, the high-dose administration of drugs is necessary to achieve their in vivo therapeutic efficacy, while this often causes the adverse effects of drugs. DDS is an engineering trial which allows a drug to act at the right time the right site of action at the necessary concentration. The objective of DDS includes the controlled release of drug, the prolongation of drug life-time, the acceleration of drug absorption, and the drug targeting. Various biomaterials are inevitably required to achieve every DDS objective. In this department, various research projects of DDS for drug and gene therapies are carried out from the viewpoint of polymer material sciences. The DDS technology and methodology are also needed to enhance

the in vivo efficacy of vaccination or magnetic resonance imaging (MRI) and ultrasound diagnosis. We are also developing DDS technology and methodology which are applicable to the research and development of cosmetics and health care sciences.

4) Biomaterials for Surgical and Physical Therapies

This department is partly originated from the division of Molecular Design and Biomaterials of the former Research Center for Biomedical Engineering where the medical applications of polymer materials have been investigated extensively. Among the research activities, we continue to molecularly design and create biomaterials mainly from biodegradable polymers aiming at their assistance in surgical and physical therapies.

From the viewpoint of biomaterial sciences, we are pursuing comprehensive researches on the scaffold for the cell proliferation and differentiation, the DDS of growth factors and the related genes, and the material-based technology or methodology to use stem, precursor, and blast cells. Through several R&D collaborations with medical, dental, and veterinary schools as well as private companies, we are planning to apply our basic research results to realize the regeneration induction therapy of various tissues and organs, such as the skin, fat, bone, cartilage, nerve, hair, blood vessels, periodontium, myocardium, and kidney as well as the DDS technologies for therapeutic, prophylactic, and diagnostic medicines, while some biomaterials are applicable for basic of medicine and biology as the research tools.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- 田畑泰彦：生体材料 (Biomaterial) も Biotechnology の仲間入り, バイオテクノロジージャーナル, **5**(1) : 18(2005)
- 田畑泰彦：再生医療を「ゆめ物語」で終わらせないために, バイオサイエンスとインダストリー, **63**(1) : 43(2005)
- 田畑泰彦：生体組織工学を利用した心・血管領域の再生医療の現状と展望, 平成 16 年セロトニン研究会報告, **12** : 3-5(2005)
- 田畑泰彦：人工ニッチをめぐす細胞の足場, スキャホールド, 臨床眼科, **59**(11) : 229(2005)
- 田畑泰彦：進化する再生医療 bFGF 製剤トラフェルミンは創傷治療に定着し, 再生医療は 3 次元的な臓器再生に向かいつつある, The Mainichi Medical Journal, News Letter, **1**(7) : 1-4(2005)
- Yamamoto, M., Takahashi, Y., and Tabata, Y.: Bone induction by controlled release of BMP-2 from a biodegradable hydrogel in various animal species —From mouse to non-human primate—. Key Engineering Materials **288-289** : 253-256(2005) .
- 山本雅哉, 田畑泰彦：線維性慢性疾患に対する組織再生誘導治療, : 日本 DDS 学会誌 20 (2) : 110-117 (2005) .
- Yamamoto, M., Takahashi, Y., Hokugo, A., and Tabata, Y.: Enhanced osteoinduction by biodegradable gelatin- β -tricalcium phosphate sponge capable for bone morphogenetic protein release. J. Hard Tissue Biol. (in press)
- 北郷明成, 山本雅哉, 田畑泰彦, 高分子ハイドロゲルを利用した細胞増殖因子の徐放化とその骨再生誘導活性, 日本繊維学会研究所講演集 **62** : 107-114(2005)
- Hokugo, A., Ozeki, M., Kawakami, O., Sugimoto, K., Mushimoto, K., Morita, S., Tabata, Y.: Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. Tissue Engineering. **11** (7-8) : 1224-1233 (2005)

- Hokugo, A., Mushimoto, K., Morita, S., Tabata, Y. : Prefabricated vascularized bone graft using autologous tissue, biomaterials, and growth factors : A New Technique for Bone Reconstruction. *Key Engineering Materials* **288-289** : 51-54(2005)
- Kushibiki, T., Tabata, Y. : Preparation of poly (ethylene glycol) -introduced cationized gelatin as a non-viral gene carrier. *J Biomater Sci Polym Ed.* **16** : 1447-1461(2005)
- Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y. : Delivery of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor by cationized gelatin to prevent interstitial renal fibrosis. *J of Controlled Release.* **105** : 318-331(2005)
- Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y. : Targeting of plasmid DNA to renal interstitial fibroblasts by cationized gelatin. *Biol Pharm Bull.* **28** : 2007-2010(2005)
- Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y. : Controlled release technology suppresses the progression of disseminated pancreatic cancer cells. In *Key Engineering Materials.* **288-289** : 121-124(2005)
- Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y. : Enhanced anti-fibrotic activity of plasmid DNA expressing small interference RNA for TGF-beta type II receptor for a mouse model of obstructive nephropathy by cationized gelatin prepared from different amine compounds. *J. Controlled Release.* (in press)
- Inoue, S., Hori, Y., Hirano, Y., Inamoto, T., and Tabata, Y. : Effect of culture substrate and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of human adipo-stromal cells. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **16(1)** : 57-77(2005)
- Inoue, I., Tabata, Y. : Proliferation and differentiation of human stromal cells derived from fat tissue on different culture substrates. In *Key Engineering Materials.* **288-289** : 15-18(2005)
- Fujita, M., Kinoshita, Y., Sato, E., Maeda, H., Ozono, S., Negishi, H., Kawase, T., Hiraoka, Y., Takamoto, T., Tabata, Y., and Kameyama, Y. : Proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells on poly(glycolic acid)-collagen sponge. *Tissue Engineering* **11(9/10)** : 1346-1355 (2005)
- Kanematsu, A., Yamamoto, S., Iwai-Kanai, E., Kanatani, I., Imamura, M., Adam, R. M., Tabata, Y., Ogawa, O. : Induction of smooth muscle cell-like phenotype in marrow-derived cells among regenerating urinary bladder smooth muscle cells. *Am J Pathol.* **166(2)** : 565-573(2005)
- Marui, A., Kanematsu, A., Yamahara, K., Doi, K., Kushibiki, T., Yamamoto, M., Itoh, H., Ikeda, T., Tabata, Y., Komeda, M. : Simultaneous application of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor to enhance the blood vessels formation. *J Vasc Surg.* **41(1)** : 82-90(2005)
- Hisasue S, Kato R, Sato Y, Suetomi T, Tabata Y, Tsukamoto T. : Cavernous nerve reconstruction with a biodegradable conduit graft and collagen sponge in the rat. *J Urol.* **173(1)** : 286-91(2005)
- Suetomi T, S. Hisasue, Sato Y, Tabata Y, Akaza H, Tsukamoto T. : Effect of basic fibroblast growth factor incorporating gelatin microspheres on erectile function in the diabetic rat. *J Urol.* **173(4)** : 1423-1428(2005)
- Nakano, T., Ishimoto, T., Umakoshi, Y., and Tabata, Y. : Texture of Biological Apatite Crystallites and the Related Mechanical Function in Regenerated and Pathological Hard Tissues. *Journal of Hard Tissue Biology.* (in press)
- Inoue, A., Takahashi, K. A., Arai, Y., Tonomura, H., Sakao, K., Saito, M., Fujioka, M., Tabata, Y., Kushibiki, T., Kubo, T. : The therapeutic effects of gelatin hydrogel microspheres-basic Fibroblast Growth Factor system on experimental osteoarthritis in the rabbit knee, *Arthritis Rheum.* (in press)

- Konishi, M., Tabata, Y., Kariya, M., Hosseinkhani, H., Suzuki, A., Fukuhara, K., Mandai, M., Takakura, K., and Fujii, S. : In vivo anti-tumor effect of dual release of cisplatin and adriamycin from biodegradable gelatin hydrogel. *J. Controlled Release*. **103** : 7-19 (2005)
- Hosseinkhani, H., Tabata, Y. : Ultrasound enhances in vivo tumor expression of plasmid DNA by PEG-introduced cationized dextran. *J. Controlled Release*. **108** : 540-556 (2005)
- Hosseinkhani, H., Inatsugu, Y., Hiraoka, Y., Inoue, S., Shimokawa, H., Tabata, Y.: Impregnation of plasmid DNA into 3-D scaffold and medium perfusion enhance in vitro DNA expression of mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*. **11** : 1459-1475 (2005)
- Hosseinkhani, H., Inatsugu, Y., Hiraoka, Y., Inoue, S., Tabata, Y. : Perfusion culture enhances osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells in collagen sponge reinforced with poly (glycolic acid) fiber. *Tissue Engineering*. **11** : 1476-1488 (2005)
- Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., Tabata, Y. : Tumore targeting of plasmid DNA by dextran conjugation based on metal coordination. In *Key Engineering Materials*. **288-289** : 109-112 (2005)
- Hosseinkhani, H., Yamamoto, M., Inatsugu, Y., Hiraoka, Y., Inoue, S., Shimokawa, H., and Tabata, Y. : Enhanced ectopic bone formation using a combination of plasmid DNA impregnation into 3-D scaffold and bioreactor perfusion culture. *Biomaterials*. (in press)
- Hosseinkhani, H., Kushibiki, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Tabata, Y. : Enhanced suppression of tumor growth using a combination of NK4 plasmid DNA-PEG engrafted cationized dextran complex and ultrasound irradiation. *Cancer Gene Therapy*. (in press)
- Hosseinkhani, H., Tabata, Y. : DNA nanoparticles for gene delivery to cells and tissue *International. J. of Nanotechnology*. (in press)
- Mima, H., Tomoshige, R., Kanamori, T., Tabata, Y., Yamamoto, Ito, S., Tamai, K., and Kaneda, Y. : Biocompatible polymer enhances the in vitro and *in vivo* transfection efficiency of HVJ envelope vector. *J. Gene Medicine* **7** : 888-897 (2005)
- Kawakami, O., Miyamoto, S., Hatano, T., Yamada, K., Hashimoto, N., Tabata, Y. : Accelerated embolization healing of aneurysms by polyethylene terephthalate coils seeded with autologous fibroblasts. *Neurosurgery*. **56** (5) : 1075-1081 (2005)
- 宮本 享, 川上 理, 波多野武人, 山田圭介, 田畑泰彦: 動脈瘤の再生誘導カテーテル治療. *DDS*. **20** (2) : 118-127 (2005)
- 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 山本一男, 櫛引俊宏, 友重龍治, 夏志銀, 原田孝司, 大園恵幸, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野茂: カチオン化ゼラチン粒子を用いた腹膜線維症における遺伝子治療の試み—HSP47 siRNA 投与による検討—. *腹膜透析の進歩 2005 腎と透析*. **58** : 132-135 (2005)
- Ohta, S., Nitta, N., Takahashi, M., Sonoda, A., Tanaka, T., Yamasaki, M., Furukawa, M., Murata, K., Sakamoto, T., Tabata, Y. : Pluronic F127 : Application to the Arterial Embolization. *JVIR*. (in press)
- 廣瀬圭一, 丸井晃, 田畑泰彦, 米田正始: bFGF と血管再生療法. *Pharma Medica*. **23** (9) : 41-45 (2005)
- Hirose, K., Marui, A., Arai, Y., Fujita, M., Nomura, T., Mitsuyama, M., Tabata, T., Komeda, M. : Sustained-release form of basic fibroblast growth factor prevents catheter-related bacterial invasion. *Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery* 2005 (in press)

- Tazaki, J., Akazawa, T., Murata, M., Yamamoto, M., Tabata, Y., Yoshimoto, R., Arisue, M. : BMP-2 dose-response and release studies in functionally graded hap. *Archives of Bioceramics Research*. **5** : 182-185(2005)
- Ozeki, M., Tabata, Y. : In vivo degradability of hydrogels prepared from different gelatins by various crosslinking methods. *J. Biometer. Polymer Edn.* **16** (5) : 549-561(2005)
- Ozeki, M., Tabata, Y. : Promoted growth of murine hair follicles by controlled release of growth factors from biodegradable hydrogel. *Key Engineering Materials*. **288-289** : 133-136(2005)
- Ozeki, M., Tabata, Y. : Interaction of hepatocyte growth factor with gelatin as the carrier material. *J. Biomater. Sci., Polym. Eds.* **17** (1-2) : 163-175(2005)
- Ozeki, M., Tabata, Y. : Affinity evaluation of gelatin for hepatocyte growth factor of different types to design the release carrier. *J. Biometer. Polymer Edn.* **17** (1-2) : 139-150(2005)
- Takahashi, Y., Yamamoto, M., and Tabata, Y. : Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. *Biomaterials*. **26** (17) : 3587-3596(2005).
- Takahashi, Y., Yamamoto, M., and Tabata, Y. : Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. *Biomaterials*. **26** (23) : 4856-4865(2005).
- Takahashi, Y., Yamamoto, M., and Tabata, Y. : Design of an osteoinductive biodegradable cell scaffold based on controlled release technology of bone morphogenetic protein. *Israel J. Chem.* **45** (4) : 465-475(2005).
- Takahashi, Y., Yamamoto, M., and Tabata, Y. : Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Engineering*. (in press)
- Sakaguchi, G., Tambara, K., Sakakibara, Y., Ozeki, M., Yamamoto, M., Premaratne, G., Lin, X., Hasegawa, K., Tabata, Y., Nishimura, K., and Komeda M. : Control-released hepatocyte growth factor prevents the progression of heart failure in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Ann. Thorac. Surg.* **79** (5) : 1627-1634(2005)
- Tambara, K., Premaratne, G. U., Sakaguchi, G., Kanemitsu, N., Lin, X., Nakajima, H., Sakakibara, Y., Kimura, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y., Ikeda, T., and Komeda, M. : Administration of control-released hepatocyte growth factor enhances the efficacy of skeletal myoblast transplantation in rat infarcted hearts by greatly increasing both quantity and quality of the graft. *Circulation*. **112** (9 Suppl) : 1129-1134(2005)
- Morino, S., Nakamura, T., Toba, T., Takahashi, M., Kushibiki, T., Tabata, Y., Shimizu, Y. : Fibroblast growth factor-2 induces recovery of pulmonary blood flow in canine emphysema models. *Chest*. **128** : 920-926(2005)
- Kasper, F. K., Kushibiki, T., Kimura, Y., Mikos, A. G., Tabata, Y. : In vivo release of plasmid DNA from composites of oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) and cationized gelatin microspheres. *J Controlled Release*. **107** : 547-561(2005)
- Kanematsu, A., Yamamoto, S., Iwai-Kanai, E., Kanatani I., Imamura, M., Adam, R. M., Tabata, Y., Ogawa, O. : Induction of smooth muscle cell-like phenotype in marrow-derived cells among regenerating urinary bladder smooth muscle cells. *The American Journal of Pathology*. **166** : 565-573(2005)
- Hiraoka, Y., Ueda, H., Kimura, Y., Tabata, Y. : Fabrication and characterization of mechanically reinforced collagen sponge. In *Key Engineering Materials*. **288-299** : 385-388(2005)
- Hiraoka, Y., Yamashiro, H., Yasuda, K., Inamoto, T., Tabata, Y. : In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Tissue Engi-*

neering. (in press)

- Theresa A. Holland, Tabata, Y., Antonios G. Mikos. : Dual growth factor delivery from degradable oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Controlled Release*. **101** : 111-125 (2005)
- Theresa A. Holland, Esther W.H. Bodde, L. Scott Baggett, Tabata, Y., Antonios G. Nikos, John A. Jansen. : Osteochondral repair in the rabbit model utilizing bilayered, degradable oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res*. **75A** 156-167 (2005)
- Takahashi, K., Takamoto, T., Tabata, Y. : Preparation of gelatin grafted with lactic acid oligomers. In *Key Engineering Materials*. **288-289** : 441-444 (2005)
- Hisatome, T., Yasunaga, Y., Yanada, S., Tabata, Y., Ikada, I., Ochi, M. : Neovascularization and bone regeneration by implantation of autologous bone marrow mononuclear cells. *Biomaterials*. **26** : 4550-4556 (2005)
- Sato, Y., Matsui, K., Ajiki, T., Igarashi, Y., Takahashi, M., Murakami, T., Hakamata, Y., Tabata, Y., Kobayashi, E. : Can a bone marrow cell contribute to organ regeneration? In vivo analysis using transgenic rats with reporter genes. *Transplantation Proceedings*. **37** : 273-275 (2005)
- Morimoto, K., Chono, S., Kosai, T., Seki, T., Tabata, Y. : Design of novel injectable cationic microspheres based on aminated gelatin for prolonged insulin action. *J. Pharm. Pharmacol*. **57** : 839-844 (2005)
- Seki, T., Kanbayashi, H., Nagao, T., Chono, S., Hayashi, M., Tabata, Y., Morimoto, K. : Effect of aminated gelatin on the nasal adsorption of insulin in rats. *Biol. Pharm. Bull*. **28** (3) : 510-514 (2005)
- Hansoo Park, Johnna S. Temenoff, Theresa A. Holland, Tabata, Y., Antonios G. Mikos. : Delivery of TGF- β 1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications. *Biomaterials*. **26** (34) : 7095-7103 (2005)
- Miyoshi, M., Kawazoe, T., Igawa, H., Tabata, Y., Ikada, Y., Suzuki, S. : Effects of bFGF incorporated into a gelatin sheet on wound healing. *J. Biomater. Sci., Polym. Eds*. **16** (7) : 893-907 (2005)
- 中原 貴, 中村達雄, 小林英三郎, 呉本晃一, 松野智宣, 田畑泰彦, 工藤一洋, 清水慶彦 : 歯根膜由来細胞播種による歯周組織の in situ ティッシュ・エンジニアリング. *歯科臨床研究*. **2** (2) : 28-34 (2005)
- Eshita, Y., Uemoto, S., Tabata, Y., Sakamoto, S., Egawa, H., Hashida, T., Inui, K., Tanaka, K. : Drug delivery system using microspheres that contain tacrolimus in porcine small bowel transplantation. *Transpl. Int*. **17** : 841-847 (2005)
- Isogai, N., Morotomi, T., Hayakawa, S., Munakata, H., Tabata, Y., Ikada, Y., Kamiishi, H. : Combined chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an articular cartilage construct. *J. Biomed. Mater. Res*. **74A** : 408-418 (2005)
- Zhao, Y., Shimizu, T., Nishihira, J., Koyama, Y., Kushibiki, T., Honda, A., Watanabe, H., Abe, R., Tabata, Y., Shimizu, H. : Tissue regeneration using macrophage migration inhibitory factor—impregnated gelatin microbeads in cutaneous wounds. *Am. J. Pathol*. **167** (6) : 1519-1529 (2005)
- Matsuura, M., Okazaki, K., Nishio, A., Nakase, H., Tamaki, H., Uchida, K., Nishi, T., Asada, M., Kawasaki, K., Fukui, T., Yoshizawa, H., Ohashi, S., Inoue, S., Kawanami, C., Hiai, H., Tabata, Y., Chiba, T. : Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis. *Gastroenterology*. **128** : 975-986 (2005)

- Iwai, K., Nakagawa, T., Endo, T., Matsuoka, Y., Kita, T., Kim, TS., Tabata, Y., Ito, J. : Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope*. (in print.)
- Endo, T., Nakagawa, T., Kita, T., Iguchi, F., Kim, TS., Tamura, T., Iwai, K., Tabata, Y., Ito, J. : A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope*. **115** : 2016-2020 (2005)
- Morimoto, K., Chono, S., Kosai, T., Seki, T., Tabata, Y. : Design of novel injectable cationic microspheres based on aminated gelatin for prolonged action of insulin. *J.Pharm.Pharmacol.* **57** : 839-844 (2005)
- Seki, T., Kanbayashi, H., Nagao, T., Chono, S., Tomita, M., Hayashi, M., Tabata, Y., Morimoto, K. : Effect of aminated gelatin on the nasal absorption of insulin in rats. *Biol.Pharm.Bull.* **28** (3) : 510-514 (2005)
- Fujiwara, H., Oda, K., Saiki, Y., Sakamoto, N., Ohashi, T., Sato, M., Tabata, Y., Tabayashi, K. : The wrapping method using biodegradable felt strips has a preventive effect on the thinning of the aortic wall.- Experimental study in the canine aorta -*Journal of Vascular Surgery* in print
- Young, S., Wong, M., Tabata, Y., Mikos, A. : Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J. Controlled Release*. **109** : 256-274 (2005)
- Kawai, K., Suzuki, S., Tabata, Y., Nishimura, Y. : Accelerated wound healing through the incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis using a pressure-induced decubitus ulcer model in genetically diabetic mice. *British J. Plastic Surgery*. **58** : 1115-1123 (2005)

2) 総 説

- 田畑泰彦：第5章 再生誘導治療と DDS. 「ソフトナノテクノロジー—バイオマテリアル革命—」(田畑泰彦編集, 株式会社シーエムシー出版, 東京) 245-257 (2005)
- 田畑泰彦：細胞増殖因子を利用した生体組織の再生誘導とその毛の成長促進への応用. 「アンチ・エイジングシリーズ 1. 白髪, 育毛, 脱毛の実際」(有限会社ブッカーズ編集, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京) 249-265 (2005)
- 田畑泰彦：生体組織工学を用いた再生誘導試料の現状—再生医療の現状の理解のために—. 「第19回「大学と科学」公開シンポジウム「人体にやさしい医療材料」」(中嶋英雄編集, 株式会社クパプロ出版, 東京) 153-169 (2005)
- 山田正敏, 田畑泰彦：水溶性フラレンと超音波を用いたがん組織の破壊. 「超音波利用技術集成—ソノケミストリーの環境・医療応用から最新のセンシング動向まで—」(有限会社ブッカーズ編集, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京) 249-259 (2005)
- Nakano, T., Tabata, Y., and Umakoshi, Y. : Texture and Bone Reinforcement. 「Encyclopedia of Materials. Science and Technology Updates」(K. H. Jürgen Buschow, etc, Elsevier, Oxford) 1-8 (2005)
- Marui, A., Doi, K., Tambara, K., Sakakibara, Y., Ueyama, K., Iwakura, A., Yamamoto, M., Ikeda, T., Tabata, Y., and Komeda, M. : Basic fibroblast growth factor and angiogenesis. 「Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches」(Mori, H. and Matsuda, H. Eds., Springer-Verlag, Tokyo) 145-156 (2005)
- Zhang, X., Tanaka, J., Yu, Y., Tabata, Y. : Advanced Biomaterials VI 「Key Engineering Materials」(Zhang, X. etc, Trans Tech Publications Inc, Switzerland) 1-687 (2005)

3) 著 書

- 田畑泰彦：骨軟骨の再生医療. 総合臨床. **54** (1) : 132-139 (2005)
- 田畑泰彦：再生医療の実現に必要な材料と先端医工学技術 再生医療. 日本再生医療学会雑誌. **4** (1) : 102-107 (2005)

- 田畑泰彦：ドラッグデリバリーシステムとティッシュエンジニアリング，ティッシュエンジニアリング：92-99 (2005)
- 田畑泰彦：DDS は tissue engineering の Key 技術 組織再生誘導治療の実際，DDS. **20** (2) : 83 (2005)
- Tabata, Y. : Therapeutic trials based on combination of drug delivery system and ultrasound. The 4th International Symposium on Therapeutic Ultrasound. American Institute of Physics, Melville. **754** : 77-80 (2005)
- 田畑泰彦：basic FGF と再生医療，Angiology Frontier. **4** (2) : 52-59 (2005)
- 田畑泰彦：再生医療の領域拓くバイオマテリアルの開発動向 ー組織の再生・臓器の代替実用化に期待される新たなバイオマテリアルー，WEB journal. **68** : 27-30 (2005)
- 田畑泰彦：生化学的なアプローチによる再生誘導治療，化学と工業，**58** (7) : 803-807 (2005)
- 田畑泰彦：再生医療の現状と歯科における可能性，日本補綴歯科学会雑誌，**49** (4) : 563-568 (2005)
- 田畑泰彦：体を自然に修復する力を引き出す技術 ー生体組織の再生誘導のための医療材料技術：生体組織工学ー，Biophilia. **1** (3) : 6-14 (2005)
- 田畑泰彦：生体組織工学による再生医療の実際ー細胞増殖の足場と生体シグナル因子の DDS 技術の重要性ー，腎と透析，**59** (3) : 520-526 (2005)
- 田畑泰彦：細胞増殖因子の徐放化技術，臨床眼科，**59** (11) : 246-255 (2005)
- 田畑泰彦：組織再生における増殖因子のコントロールリリース，日本 DDS 学会創立 20 周年記念“DDS 研究の現状と将来展望” Pharm Tech Japan2005 年秋臨時増刊号 **21** (12) : 113-118 (2005)
- Tabata, Y. : Significant role of cell scaffolding and DDS technology in tissue regeneration. Tissue engineering strategies. International Congress Series. **1284** : 257-265 (2005)
- Tabata, Y. : Significance of release technology in tissue engineering. Drug Discovery Today. **23/24** : 639-1646 (2005)
- 山本雅哉，田畑泰彦：線維性慢性疾患に対する組織再生誘導治療，DDS. **20** (2) : 110-117 (2005)
- 廣瀬圭一，丸井 晃，田畑泰彦，米田正始：bFGF と血管再生療法，Pharma Medica. **23** (9) : 41-45 (2005)
- 山田正敏，田畑泰彦：超音波と DDS を組み合わせたがん治療法，生体医工学，**43** (2) : 238-246 (2005)
- 小川源太郎，田畑泰彦：人工皮膚（コラーゲン膜），「膜(MEMBRANE)」**31** (1) : in press (2005)
- Nagaya, N., Fumuyama, N., Tabata, Y., and Mori, H. : Potentiation of regenerative therapy by non-viral vector, gelatin hydrogel. Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches, H. Mori and H. Matsuda Eds., Springer-Verlag : 17-30 (2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 田畑泰彦：循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製，平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業研究成果発表会 (2005.2.21, 豊中)
- 山本雅哉，高橋佳丈，田畑泰彦：リン酸三カルシウム微粒子含有ゼラチンスポンジを用いた in vitro および in vivo における骨形成，第 29 回骨カルシウム代謝研究会 (2005.3.4 京都)
- Yamamoto, M., Jo, J., Okazaki, A., Ikai, T., Hirano, Y., and Tabata, Y. : Polysaccharide-based non-viral gene delivery system for adult stem cells. 32nd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society (2005.6.18-22 Miami)

山本雅哉, 柳瀬薫, 田畑泰彦: コラーゲン傾斜機能化ハイドロゲル上での線維芽細胞の培養. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13 東京)

山本雅哉, 柳瀬薫, 竹越稯, 田畑泰彦: 傾斜機能化ハイドロゲルの作製とその細胞との相互作用. 第8回日本組織工学会 (2005.9.1-2 東京)

Yamamoto, M., Takahashi, Y., Hokugo, A., and Tabata, Y.: Enhanced osteoinduction by biodegradable gelatin- β -tricalcium phosphate sponge capable for bone morphogenetic protein release. International Symposium of Maxillofacial and Oral Regenerative Biology (2005. 9. 17-19 Okayama)

Yamamoto, M., Yanase, K., and Tabata, Y.: Fibroblasts adhesion for polyacrylamide hydrogels with functional gradient. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25 Shanghai)

山本雅哉, 柳瀬薫, 竹越稯, 田畑泰彦: タンパク質を固定化した傾斜機能化足場材料の創製. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

Yamamoto, M., Takahashi, Y., Hokugo, A., and Tabata, Y.: Enhanced osteoinduction by biodegradable gelatin-beta-tricalcium phosphate sponge capable for bone morphogenetic protein release The 8th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems (2005.12.18-23 Hawaii)

北郷明成, 杉本圭介, 福田あおい, 澤田育典, 虫本浩三, 森田章介, 田畑泰彦: 生体吸収性ハイドロゲルを用いた血小板内細胞増殖因子の徐放化と骨再生. 第36回日本口腔外科学会近畿地方会 (2005.6.11 滋賀)

北郷明成, 田畑泰彦: 生体吸収性ハイドロゲルによる血小板内細胞増殖因子の徐放化と骨再生促進. 第26回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13 東京)

北郷明成, 田畑泰彦: 生体吸収性ハイドロゲルを用いた徐放化血小板内細胞増殖因子による頭蓋骨再生. 第14回硬組織再生生物学会総会 (2005.9.17-20 岡山)

Hokugo, A., Takamoto, T., Tabata, Y.: Fabrication and cyto-compatibility of fibrin sponge reinforced with biodegradable polymer fiber. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25 Shanghai)

北郷明成, 高本智紹, 田畑泰彦: 生体吸収性繊維で力学強化した Tissue Engineering のための scaffold の作製. 第13回顎顔面バイオメカニクス学会 (2005.11.19-20 大阪)

北郷明成, 高本智紹, 田畑泰彦: Cell scaffold としての fibrin sponge と collagen sponge の比較. 第27回日本バイオマテリアル学会 (2005.11.28-29 京都)

Hokugo, A., Tabata, Y.: Enhanced regeneration repairing of cranial bone by platelet growth factors released from biodegradable hydrogel. 8th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems (2005.12.18-23 Hawaii)

Kushibiki, T., Tabata, Y.: Blockade of TGF-beta 1 receptor II expression inhibits interstitial renal fibrosis by targeting of small interference RNA to renal interstitial fibroblasts. The 3th KIPS-NIST (2005.5.19-20 Kyoto)

櫛引俊宏, 中島奈津紀, 菅井学, 清水章, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンを用いた siRNA の腎間質へのデリバリー. 第54回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)

櫛引俊宏, 田畑泰彦: 遺伝子導入のためのゼラチンとポリエチレングリコールとからなる分子集合体の作製. 第21回日本 DDS 学会 (2005.7.22-23 長崎)

木村 祐, 野一尚子, 稲本 俊, 田畑泰彦: 組成の異なる生体吸収性足場材料による脂肪組織の再生誘導. 第54回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)

木村 祐, 野一尚子, 稲本 俊, 田畑泰彦: 生体分子を組み込んだ吸収性足場材料を用いた脂肪組織の再生誘導.

第 26 回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13 東京)

木村 祐, 尾関 真, 谷川麻世, 田畑泰彦, 石黒智之, 深野兼司: 種々の架橋方法を用いた細胞増殖因子の徐放のためのゼラチンハイドロゲルの作製. 第 34 回医用高分子シンポジウム (2005.8.1-2 東京)

木村 祐, 谷川麻世, 石黒智之, 深野兼司, 田畑泰彦: 電子線架橋による細胞増殖因子の徐放のためのゼラチンハイドロゲルの作製. 第 8 回日本組織工学会 (2005.9.1-2 東京)

Kimura, Y., Noichi, N., Inamoto, T., Tabata, Y.: Regeneration induction of adipose tissue by scaffold with different compositions. The 8th annual meeting of tissue engineering society international (8TESI) (2005.10.22-25 Shanghai)

木村 祐, 山城大泰, 辻和香子, 平岡陽介, 稲本 俊, 田畑泰彦: 徐放化 bFGF とコラーゲンスポンジを用いた脂肪組織の *in situ* 再生誘導. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

井上幸子, 田畑泰彦: ヒト脂肪前駆細胞の増殖と脂肪分化に与える高分子基材の官能基の影響. 第 54 回高分子年次大会 (2005.5.25-27 横浜)

井上幸子, 田畑泰彦: ヒト脂肪前駆細胞の増殖と脂肪分化に影響を与える塩基性線維芽増殖因子の添加効果. 第 26 回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13 東京)

Inoue, S. and Tabata, Y.: Proliferation and differentiation of stem cells on different surfaces of self-assembled monolayers. The 8th Society of Polymer Science Japan (SPSJ) international Polymer Conference (2005. 7.26-29 Fukuoka)

井上幸子, 田畑泰彦: 塩基性線維芽細胞増殖因子とともに培養したヒト脂肪前駆細胞の脂肪分化. 第 8 回日本組織工学会 (2005.9.1-2 東京)

井上幸子, 堀由香奈, 平野義明, 田畑泰彦: 種々の高分子表面上での組織幹細胞の増殖と分化挙動. 第 54 回高分子討論会 (2005.9.20-22 山形)

Inoue, S. and Tabata, Y.: Basic fibroblast growth factor influences proliferation and differentiation of human adipose-derived stromal cells. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25 Shanghai)

井上幸子, 大谷義昭, 平野義明, 田畑泰彦: 異なる官能基を持つ表面での脂肪前駆細胞の接着・増殖・分化. 第 27 回日本バイオマテリアル学会 (2005.11.28-29 京都)

劉健, 山本雅哉, 大田信一, 園田明永, 新田哲久, 田中豊彦, 村田喜代史, 田畑泰彦: MRI 造影効果を持つフラーレン誘導体の作製とその抗がん活性の評価. 第 27 回日本バイオマテリアル学会 (2005.11.28-29 京都)

城潤一郎, 山本雅哉, 岡崎有道, 猪飼智範, 平野義明, 田畑泰彦: カチオン化多糖誘導体を用いた組織幹細胞への *in vitro* 遺伝子導入の増強. 第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)

城潤一郎, 岡崎有道, 猪飼智範, 山本雅哉, 平野義明, 田畑泰彦: カチオン化多糖誘導体を用いた骨髓由来間葉系幹細胞への *in vitro* 遺伝子導入. 第 26 回日本炎症再生医学会 (2005.7.12-13 東京)

城潤一郎, 岡崎有道, 猪飼智範, 山本雅哉, 平野義明, 田畑泰彦: カチオン化多糖誘導体を用いた骨髓由来間葉系幹細胞への遺伝子発現の増強. 第 21 回日本 DDS 学会 (2005.7.22-23 長崎)

城潤一郎, 永谷憲哉, 宮原義典, 寒川賢治, 田畑泰彦: 遺伝子改変した骨髓由来間葉系幹細胞の心筋内移植によるラット急性心筋梗塞の治療. 第 8 回日本組織工学会 (2005.9.1-2 東京)

Jo, J., Nagaya, N., Miyahara, Y., Kangawa, K., and Tabata, Y.: Transplantation of mesenchymal stem cells genetically engineered to treat acute myocardial infarction in rats. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society

International (2005.10.22-25 Shanghai)

城潤一郎, 永谷憲歳, 宮原義典, 寒川賢治, 田畑泰彦: 骨髄由来間葉系幹細胞の遺伝子改変による心筋梗塞治療効果の増強. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

Jo, J., Yamamoto, M., Okazaki, A., Ikai, T., Hirano, Y., and Tabata, Y. : Effect of physicochemical properties of cationized pullulan complexed with plasmid DNA on the level of gene expression for mesenchymal stem cells. The 8th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems (2005.11.18-23 Hawaii)

高本智紹, 平岡陽介, 田畑泰彦: PET 繊維強化コラーゲンスポンジ中での骨髄間葉系幹細胞の増殖と分化. 第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)

高本智紹, 平岡陽介, 田畑泰彦: 力学強化コラーゲンスポンジ内でのラット骨髄間葉系幹細胞の増殖と骨分化. 第 26 回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13 東京)

高本智紹, 平岡陽介, 田畑泰彦: 骨髄間葉系幹細胞の培養に与えるコラーゲンスポンジの力学特性の影響. 第 8 回日本組織工学会 (2005.9.1-2 東京)

高本智紹, 平岡陽介, 市戸義久, 田畑泰彦: 繊維強化コラーゲンスポンジ内での骨髄間葉系幹細胞の増殖に与える培養方法の影響. バイオマテリアル学会 (2005.11.28-29 京都)

Tomoaki Takamoto, Norihisa Ichinohe, Yosuke Hiraoka, and Yasuhiko Tabata : Proliferation enhancement of mesenchymal stem cells in fiber-reinforced collagen scaffold with bioreactor. The 8th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems (2005.12.18-23 Hawaii)

岡崎有道, 城潤一郎, 田畑泰彦: カチオン化多糖を用いたリパーストランスフェクションによる幹細胞への遺伝子導入. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

猪飼智範, 城潤一郎, 岡崎有道, 山本雅哉, 平野義明, 田畑泰彦: 肝臓への *in vivo* 遺伝子導入のためのカチオン化プルランの作製. 第 27 回日本バイオマテリアル学会 (2005.9.28-29 京都)

谷川麻世, 金井夏子, 田畑泰彦: セリシン誘導体を用いた酸化チタンの分散安定化と表面活性制御. バイオマテリアル学会 (2005.11.28-29 京都)

野一尚子, 木村祐, 田畑泰彦: 架橋度の異なるコラーゲンスポンジ上での脂肪前駆細胞の増殖・分化. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

岡空高広, 櫛引俊宏, 岡崎有道, 田畑泰彦: マクロファージへの遺伝子導入のための高分子キャリアのデザイン. 第 51 回高分子研究発表会 (2005.7.22 神戸)

宮崎伸彦, 木村 祐, 藤川智行, 田畑泰彦: ポリ乳酸グラフト化ゼラチンハイドロゲルの作製. 第 51 回高分子研究発表会 (2005.7.22 神戸)

上田寛樹, 中村達雄, 福田正順, 田畑泰彦: 骨組織再生に用いるコラーゲンスポンジのポアサイズの影響. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28 京都)

金谷 勲: 吸収性人工材料による尿道再生: 第 3 回 COE 若手研究者発表会 (2005.3.17 京都)

金谷 勲, 兼松明弘, 今村正明, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修: 吸収性人工材料による尿道再生の試み. 第 93 回日本泌尿器科学会総会 (2005.4.14 東京)

金谷 勲, 兼松明弘, 今村正明, 山本新吾, 田畑泰彦, 小川 修, 筏 義人: 生体吸収性人工合成材料による尿道再生. 第 2 回泌尿器科再建再生研究会 (2005.6.18 東京)

金谷 勲, 今村正明, 兼松明弘, 稲継泰之, 山本新吾, 小川 修, 田畑泰彦, 筏 義人: 生体吸収性人工材料による尿道再生. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会. (2005.11.29 京都)

- 今村正明, 兼松明弘, 金谷 勲, 山本新吾, 小川 修, 田畑泰彦: 無細胞材料における膀胱平滑筋の再生機序—骨髄由来細胞と膀胱の増殖因子環境の関与について—, 第2回泌尿器科再建再生研究会 (2005.6.18 東京)
- 今村正明, 金谷 勲, 兼松明弘, 山本新吾, 小川 修, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルを用いた bFGF 膀胱作用機序の解明, 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.29 京都)
- 小川源太郎, 井上幸子, 田畑泰彦: BMP-2 遺伝子導入したヒト脂肪前駆細胞の in vitro 骨分化誘導, 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)
- 木村雄太, 北郷明成, 黒澤 尚, 田畑泰彦: b-FGF 徐放の多孔構造への骨進入促進作用, 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)
- 市戸義久, 高本智紹, 田畑泰彦: 不織布内での骨髄幹細胞培養に与えるバイオリアクタの影響, 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)
- 市戸義久, 塩田博之, 関 康夫, 久保木芳徳, 田畑泰彦, 三高俊広: チタン不織布を用いた bFGF 徐放と骨再生, 第12回北海道遺伝子治療・再生医療研究会 (2005.12.2 札幌)
- 堀 邦子, 尾関 真, 木村祐, 小泉範子, 外園千恵, 木下 茂, 田畑泰彦: 表面への増殖因子徐放キャリアとしてのゼラチンハイドロゲルの有用性, 第29回角膜カンファランス (2005.2.17-19 徳島)
- 堀 邦子, 外園千恵, 山崎健太, 尾関 真, 木村 祐, 田畑泰彦, 木下 茂: 眼表面へのゼラチンハイドロゲルからの増殖因子徐放効果, 第109回日本眼科学会総会 (2005.3.24-27 京都)
- Hori, K., Sotozono, C., Yamasaki, K., Ozeki, M., Kimura, Y., Tabata, Y., Kinoshita, S., : Gelatin Hydrogel as Controlled-Release Carrier of Growth Factor on Ocular Surface. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, 2005 (2005.5.1-5 Fort Lauderdale, Florida)
- Hosseinkhani, H., Kobayashi, H., Tabata, Y. : Selective differentiation of cardiomyocytes cells by using self assembly of peptide amphiphile nanofibers nanoscaffold. 6th Royan International Congress on Reproductive Biomedicine, September (2005.7.9 Tehran)
- Hosseinkhani, H., Kobayashi, H., Tabata, Y. : Design of a nano-vessel-like network for controlled proliferation and differentiation of Mesenchymal Stem Cells (MSC) regenerative medicine. 4th ISPST (International Seminar on Polymer Science and Technology) (2005.9.27-29 Tehran)
- Hosseinkhani, H., Kobayashi, H., Tabata, Y. : Design of a nano-vessel-like network for controlled proliferation and differentiation of Mesenchymal Stem Cells (MSC). 8th Tissue Engineering Society International (TESI) annual meeting (2005.10.22-25 Shanghai)
- Hosseinkhani, H., Kobayashi, H., Tabata, Y. : Selective differentiation cardiomyocyte cells by using peptide-amphiphile nanofibers) . The 42nd Japanese Peptide Symposium (2005.10.27-29 Osaka)
- Hosseinkhani, H., Kobayashi, H., Tabata, Y. : Design of tissue-engineered nano-scaffold using peptide-amphiphile for regenerative medicine. The 42nd Japanese Peptide Symposium (2005.10.27-29 Osaka)
- Hosseinkhani, H., Kobayashi, H., Tabata, Y. : Selective differentiation of mesenchymal stem cells by using self-assembled peptide-amphiphile nanofibers. The 8th US-Japan on Drug Delivery Systems (2005.12.18-23 Hawaii)
- 宮部さやか, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 骨粗鬆症ラットモデルに対する結晶学的アプローチ, 日本金属大会 2005 年春期 (第136) 大会 (2005.3.29-31 横浜)
- 宮部さやか, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 結晶学的アプローチによる骨粗鬆症ラットモデルの解析, 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

- 李 志旭, 中野貴由, 馬越佑吉, 豊澤悟, 田畑泰彦: 遺伝子組み換えマウスを用いた硬組織疾患の結晶学的解析, 日本金属大会 2005 年春期 (第 136 回) 大会 (2005.3.29-31 横浜)
- 李 志旭, 中野貴由, 馬越佑吉, 豊澤 悟, 田畑泰彦: op/op マウスモデルを用いた生体アパタイト配向化機構の解明, 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)
- 石本卓也, 吉田喜人, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 再生硬組織に対する材料学的評価法の検討, 日本金属大会 2005 年春期 (第 136 回) 大会 (2005.3.29-31 横浜)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 高橋佳丈, 田畑泰彦: BMP 徐放化による家兎尺骨欠損部の再生プロセスの解析と骨力学機能評価, 第 26 回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12-13 東京)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 結晶学的アプローチによる骨再生過程の解明, 日本第 49 回学術会議材料研究連合講演会 (2005.9.15-16 京都)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 田畑泰彦: ナノインデンテーションによる骨ヤング率解析法の検討, 日本金属学会 2005 年秋期 (第 137 回) 大会 (2005.9.28-30 広島)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 骨力学機能の再生に対するアパタイト密度ならびに配向性の役割, 日本金属学会 2005 年秋期 (第 137 回) 大会 (2005.9.28-30 広島)
- 石本卓也, 中野貴由, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: BMP 徐放による骨欠損部修復課程における力学機能の回復, 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)
- 中野貴由, 宮部さやか, 馬越佑吉, 山本雅哉, 田畑泰彦: 結晶工学的アプローチによる新しい骨質評価法による骨粗鬆症ラットモデルの解析, 日本骨代謝学会学術集会 (2005.7.21-23 大阪)
- 中野貴由, 馬越佑吉, 田畑泰彦: 生体硬組織への材料工学的アプローチと力学機能の解析, 日本第 49 回学術会議材料研究連合講演会 (2005.9.15-16 京都)
- 中野貴由, 馬越佑吉, 田畑泰彦: 再生・疾患硬組織のアパタイト配向性と力学機能変化, 口腔顔面頭蓋再生研究国際シンポジウム・第 14 回硬組織再生生物学会・第 5 回日本外傷歯学会 (アジア外傷歯シンポジウム) (2005.9.17-20 岡山)
- 中野貴由, 石本卓也, 馬越佑吉, 山本雅哉, 北郷明成, 田畑泰彦: 硬組織再生過程における in vivo 応力, アパタイト結晶配向, 力学機能の相関, 第 13 回顎顔面バイオメカニクス学会 (2005.11.19-20 大阪)
- 中野貴由, 石本卓也, 李志旭, 馬越佑吉, 田畑泰彦: 生体・再生・疾患硬組織における生体アパタイト結晶の配向性と力学機能との相関, 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)
- 美馬秀俊, 金田安史, 田畑泰彦: 生体適合性ポリマーを用いた遺伝子導入増強法の開発, 第 64 回日本癌学会学術総会 (2005. 9.14 札幌)
- 平野義明, 西下直希, 田畑泰彦, 岡 勝仁: RGDS ペプチドを用いた組織工学用足場材料の創成, 第 8 回日本組織工学会 (2005.9.1-2 東京)
- 西下直希, 井内 匡, 田畑泰彦, 岡 勝仁, 平野義明: RGDS 配列を含む自己組織化 β -シートペプチドの分子設計, 第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)
- 西下直希, 森本佳孝, 田畑泰彦, 岡 勝仁, 平野義明: RGDS 配列を含む自己組織化ペプチドの合成と機能評価, 第 54 回高分子学会討論会 (2005.9.20-22 山形)
- 西下直希, 森本佳孝, 田畑泰彦, 岡 勝仁, 平野義明: 自己組織化ペプチドを用いた細胞接着性ペプチドスキャホールドの設計, 第 42 回ペプチド討論会 (2005.10.27-28 大阪)
- 西下直希, 森本佳孝, 田畑泰彦, 岡 勝仁, 平野義明: 自己組織化 β シート構造を有する細胞接着性スキャホー

ルドの設計. 第 22 回関西地区ペプチドセミナー (2005.12.10 神戸)

Inoue, A., Arai, Y., Takahashi, K.A., Tonomura, H., Sakao, K., Saito, M., M., Tabata, Y., Kushibiki, T., Kubo, T. : The Therapeutic Effects of Gelatin Hydrogel-basic Fibroblast Growth Factor System on Experimental Osteoarthritis in the Rabbit Knee, The 51th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (2005.2.20-23 Washington DC)

Inoue, A., Takahashi, K.A., Arai, Y., Tonomura, H., Sakao, K., Saito, M., M., Tabata, Y., Kubo, T. : The Therapeutic Effects of Gelatin Hydrogel -basic Fibroblast Growth Factor System on Experimental Osteoarthritis in the Rabbit Knee, American College of Rheumatology The 69th Annual Scientific Meeting (2005.11.14-18 San Diego)

中島 (長田) 奈津紀, 権田裕之, 田畑泰彦, 横田義史, 清水 章, 菅井 学: 分化抑制因子 Id2 による B 細胞最終分化抑制機構の解析. 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005.12.7-10 福岡)

武本 啓, 森本尚樹, 鈴木茂彦, 平 嗣良, 木村 祐, 田畑泰彦: コラーゲン/ゼラチンスポンジにおける bFGF 徐放. 第 14 回日本形成外科学会基礎学術集会 (2005.10.14-15 東京)

Kawakami, O., Miyamoto, S., Hatano, T., Yamada, K., Hashimoto, N., Tabata, Y. : A therapeutic trial of cerebral aneurysm by coils combined with hydrogels for the controlled release of basic fibroblast growth factor. 32nd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society (2005.6.18-22 Florida)

森本尚樹, 武本 啓, 川添 剛, 鈴木茂彦, 富畑賢司, 平 嗣良, 田畑泰彦: 培養皮膚の生着率向上への試み. 第 8 回日本組織工学会 (2005.9.1-2 東京)

新井善雄, 丸井 晃, 廣瀬圭一, 阪口仁寿, 黄玉紅, Bir Shyamal Chandra, 池田 義, 田畑泰彦, 米田正始: 重症虚血肢に対する bFGF 臨床応用にむけての更なる工夫. 2005 Kyoto 新治療勉強会 (2005.10.13 京都)

Arai, Y., Marui, A., Hirose, K., Sakaguchi, H., Huang, Y., Chandra, B. S., Yamamoto, M., Tabata, Y., and Komeda, M. : Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia with use of sustained release of basic fibroblast growth factor from a biodegradable gelatin hydrogel. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25 Shanghai)

Arai, Y., Fujita, M., Marui, A., Hirose, K., Sakaguchi, H., Huang, Y., Bir Shyamal Chandra., Ikeda, T., Tabata, Y., Komeda, M. : Simultaneous Heparin Administration With Sustained-release Basic Fibroblast Growth Factor Enhances Angiogenesis in Hypercholesterolemic Mouse Hindlimb Ischemia. 2005 American heart association (2005.11.13-16 Dallas)

新井善雄, 丸井 晃, 広瀬圭一, 阪口仁寿, 黄 玉紅, Bir Shyamal Chandra, 仁科 健, 池田 義, 田畑泰彦, 米田正始: 重症下肢虚血に対する塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 徐放システムを用いた血管新生療法. 第 46 回日本脈管学会総会 (2005.12.1-3 大阪)

大田信一, 新田哲久, 田中豊彦, 友澤祐樹, 古川顕, 高橋雅士, 村田喜代史, 櫛引俊宏, 木村祐, 田畑泰彦: 分解時間可変ゼラチン粒子-塞栓効果の検討. 第 64 回日本医学放射線学会総会 (2005.4.11-13 横浜)

大田信一, 新田哲久, 園田明永, 村田喜代史, 木村祐, 田畑泰彦: Gelatin microspheres-血管内治療への応用. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

Nitta, N., Ohta, S., Takahashi, M., Tanaka, T., Murata, K., Tabata, T. : Embolization materials : Is your choice correct? RSNA2005 (2005.11.26-12.2 Chicago)

Ishida, K., Kuroda, R., Tabata, Y., Hokugo, A., Sasaki, K., Miwa, M., Sakai, Y., Kurosaka, M. : Platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel promotes rabbit meniscal tissue regeneration. 8th Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25 Shanghai)

Sasaki, K., Kubo, S., Matsui, N., Ishida, K., Kuroda, R., Matsushita, T., Tabata, Y., Kurosaka, M. : Use of basic fibroblast growth factor combined with a biodegradable gelatin hydrogel to enhance healing of the avascular region of canine menisci. 8th Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25 Shanghai)

長江将輝, 池田 巧, 三上靖夫, 長谷 斉, 小澤一史, 田畑泰彦, 久保俊一, 河田光博: 多血小板血漿 (PRP) とゼラチンハイドロゲル粒子を用いた変性椎間板内投与に対する組織学的検討. 第46回日本組織細胞化学学会学術集会 (2005.10.1-2. 京都)

長江将輝, 池田 巧, 三上靖夫, 河田光博, 田畑泰彦, 久保俊一: 多血小板血漿 (PRP) とゼラチンハイドロゲル粒子を用いた椎間板変性に対する治療法の検討. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会 (2005.10.20-21 伊勢)

Takaba, K., Nemoto, S., Saji, Y., Jiang, C., Ikeda, T., Azuma, T., Urayama, S., Tsutsumi, S., Tabata, Y., Komeda, M. : Bio-CABG, Not Only Arteriogenesis is but also a "Bypass" Surgery, to Expand the Surgical Arena in the Era of Drug Eluting Stents-A Pre-Clinical Study. 85th American Association For Thoracic Surgery (2005.4.10-13 San Francisco)

Takaba, K., Nemoto, S., Saji, Y., Miyasita, K., Itoh, H., Ikeda, T., Tabata, Y., Komeda, M. : A new surgery for diffuse coronary disease, "Bio-CABG" may work by the interaction of multiple angiogenic factors from the omental flap. 4th EACTS/ESTS Joint Meeting and Techno College (2005.9.24-28 Barcelona)

Takaba, K., Nemoto, S., Saji, Y., Jiang, C., Ikeda, T., Urayama, S., Azuma, T., Tsutsumi, S., Tabata, Y., Komeda, M. : Induction of Arteriogenesis in Chronic Ischemic Myocardium by a Combination of bFGF and Omentopexy as Extra Cardiac Blood Source. 日本循環器学会第69回学術集会 (2005.3.19-21 横浜)

鷹羽浄顕, 丹原圭一, 植山浩二, 根本慎太郎, 仁科 健, 山本雅哉, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: 重症虚血性心筋所に対する 'バイオ CABG' の臨床応用—生物学的微小血管吻合術—. 第3回京大臨床再生心臓血管研究会 (2005.2.2 京都)

鷹羽浄顕, 根本慎太郎, 田畑泰彦, 米田正始: 冠動脈微小血管病変に対する血管吻合術不要の新術式バイオバイパスの確立. 第10回心臓血管病研究助成発表会 (2005.2.26 東京)

鷹羽浄顕, 根本慎太郎, 姜 春力, 佐治嘉章, 宮下和季, 東 高志, 伊藤 裕, 堤 定美, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: 重症冠動脈疾患に対する新たな治療戦略としてのバイオ CABG の研究開発とその臨床応用. 第26回日本炎症・再生学会 (2005.7.12-13 東京)

鷹羽浄顕, 根本慎太郎, 姜 春力, 佐治嘉章, 宮下和季, 北郷明成, 東 高志, 山本雅哉, 伊藤 裕, 堤 定美, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始: 高度び慢性冠動脈病変に対する新術式バイオ CABG の慢性心筋虚血モデルにおける臨床前研究. 第58回日本胸部外科学会定期学術集会 (2005.10.5-7 岡山)

辻和香子, 山城大泰, 加藤大典, 稲本俊, 野一尚子, 井上幸子, 木村 祐, 田畑泰彦: ヒト脂肪由来 stromal 細胞の増殖と分化について. 第27回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

中江美佳, 神谷英紀, 成瀬桂子, 濱田洋司, 中島英太郎, 渡会敦子, 木村那智, 中村信久, 戸崎貴博, 田畑泰彦, 大磯ユタカ, 中村二郎: 糖尿病性神経障害に対する bFGF の効果—ゼラチン架橋体複合体と単筋注との比較—. 第48回日本糖尿病学会年次学術総会 (2005.5.12-14 神戸)

Nakae, M., Nakamura, J., Kamiya, H., Naruse, K., Horio, N., Ito, I., Horiguchi, M., Tabata, Y., Oiso, Y., Hotta, N. : Long-term effects of intramuscular injection of bFGF with crosslinked gelatin hydrogel on diabetic neuropathy in rats. 15th Annual Meeting of the Diabetic Neuropathy Study Group of the EASD (2005.9.8-11 Porto Heli)

稲田 聡, 藤原 斉, 高嶋一博, 阿辻清人, 田畑泰彦, 城潤一郎, 山岸久一: 非ウイルスベクターであるカチオン

- 化多糖類を用いた癌に対する遺伝子療法. 第 105 回日本外科学会定期学術集会(2005.5.11-13 名古屋)
- 稲田 聡, 藤原 斉, 高嶋一博, 阿辻 清人, 田畑 泰彦, 城潤一郎, 山岸久一: カチオン化プルランを用いた癌に対する遺伝子療法. 第 26 回癌免疫外科研究会 (2005.5.19-20 東京)
- 稲田 聡, 藤原 斉, 阿辻清人, 荒木康伸, 田畑 泰彦, 山岸久一: カチオン化多糖類を用いた癌に対する遺伝子治療の基礎的研究. 第 14 回日本癌病態治療研究会 (2005.6.23-24 札幌)
- 稲田 聡, 藤原 斉, 高嶋一博, 阿辻清人, 田畑泰彦, 城潤一郎, 山岸久一: 非ウイルスベクターであるカチオン化多糖類を用いた癌に対する遺伝子療法. 第 60 回日本消化器外科学会定期学術集会 (2005.7.20-22 東京)
- Kanemitsu, N., Tambara, K., Premaratne G.U., Kimura, Y., Tabata, Y., Komeda, M.: Control-release of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) enhances the efficacy of myoblast transplantation in chronic myocardial infarction(MI) model. The 13th ASCVS (Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Surgery) (2005.2.5-8 Chiang Mai)
- 金光尚樹, 丹原圭一, 榊原 裕, 植山浩二, 岩倉 篤, 鷹羽浄顕, 根本慎太郎, 山本雅哉, 田畑泰彦, 米田正始: 心臓外科領域再生医療での医工連携—細胞増殖因子徐放と細胞移植を併用した新たな外科的治療法. 第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1-2 大阪)
- 金光尚樹, 丹原圭一, 榊原 裕, 中島博之, 木村 祐, 山本雅哉, 田畑泰彦, 米田正始: 慢性心筋梗塞に対する塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 徐放投与の最適化. 第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1-2 大阪)
- Kanemitsu, N., Tambara, K., Premaratne, G.U., Kimura, Y., Tabata, Y., Komeda, M.: Control-release of insulin-like growth factor-1 enhances the efficacy of skeletal myoblast transplantation in chronic myocardial ischemia model. 第 69 回日本循環器学会学術総会 (2005.3.19-21 横浜)
- Kanemitsu, N., Tambara, K., Sakakibara, Y., Premaratne, U.G., Xue, L., Yamamoto, M., Tabata, Y., Komeda, M.: Integrated Cardiac Regeneration Therapy- Combination of Control-Released Growth Factors, Cell Transplantation, and Surgery. 8th TESI Annual Meeting (2005.10.22-25 Shanghai)
- Xia, Z., Abe, K., Miyazaki, M., Obata, Y., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Harada, T., Tabata, Y., Koji, T., Kohno, S.: Small interfering RNA targeting heat shock protein47 (HSP47) ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. The 9th Research Forum on Progressive Renal Diseases (2005.2.12 名古屋)
- Xia, Z., Miyazaki, M., Abe, K., Obata, Y., Kushibiki, T., Tomoshige, R., Harada, T., Tabata, Y., Koji, T., Kohno, S.: Suppression of tubulointerstitial fibrosis by small interfering RNA targeting heat shock protein47 (HSP47) conjugated with cationized gelatin microspheres in unilateral ureteral obstruction. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25 Shanghai)
- 夏 志銀, 宮崎正信, 阿部克成, 小畑陽子, 櫛引俊宏, 友重龍治, 堀田 覺, 田畑泰彦, 小路武彦, 河野 茂: HSP 47 siRNA conjugated with cationized gelatin microspheres (CGM) ameliorates renal interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction 第 48 回日本腎臓学会学術総会 (2005.6.23-25 横浜)
- 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 原田孝司, 山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野茂: Hepatocyte Growth Factor (HGF) 遺伝子導入マクロファージを用いた腹膜線維化抑制効果の検討第 50 回日本透析医学会学術総会(2005.6.24-26 横浜)
- 小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野茂: カチオン化ゼラチン粒子を用いた腹膜線維症における遺伝子治療の試み—HSP47 siRNA 投与による検討—第 21 回日本 DDS 学会 (2005.7.22-23 長崎)

Obata, Y., Miyazaki, M., Abe, K., Yamamoto, K., Kushibiki, T., Matsuyama, T., Koji, T., Tabata, Y., Kohno, S.: HGF gene transfer by genetically modified macrophages attenuates peritoneal fibrosis in mice. The 7th European aperitoneal Dialysis Meeting (2005.10.15-18 Prague)

Obata, Y., Miyazaki, M., Abe, K., Yamamoto, K., Kushibiki, T., Matsuyama, T., Koji, T., Tabata, Y., Kohno, S.: HGF gene transfer by macrophages ameliorates progression of peritoneal fibrosis in mice. American Society of Nephrology The 38th Annual Renal Week Meeting (2005.11.10-13 Philadelphia)

小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野 茂: カチオン化ゼラチン粒子を用いた HSP47 siRNA 投与による臓器線維症における遺伝子治療の試み—腎, 腹膜を中心に—. 第 27 回日本バイオマテリアル学会 (2005.11.28-29 京都)

小畑陽子, 宮崎正信, 阿部克成, 山本一男, 友重龍治, 櫛引俊宏, 松山俊文, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野茂: カチオン化ゼラチン粒子を用いた腹膜線維症における遺伝子治療の試み—HSP47 siRNA 投与による検討—第 20 回長崎 DDS 研究会 (2005.12.2 長崎)

阿部克成, 宮崎正信, 小畑陽子, 蔵重智美, 中沢有香, 原田孝司, 緒方弘文, 大園恵幸, 小路武彦, 田畑泰彦, 河野茂: Matrix metalloproteinase (MMP)-1 は腹膜の線維化を促進する 第 48 回日本腎臓学会学術総会 (2005.6.23-25 横浜)

Abe, K., Miyazaki, M., Obata, Y., Yoshio, Y., Taguchi, T., Koji, T., Tabata, T., Kohno, S.: Sustained release of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) augments the fibrotic area in chlorhexidine gluconate induced peritoneal fibrosis model in mice. The 7th European aperitoneal Dialysis Meeting (2005.10.15-18 Prague)

阿部克成, 宮崎正信, 小畑陽子, 中沢有香, 中沢将之, 蔵重智美, 原田孝司, 小路武彦, 田畑泰彦, 田口尚, 河野茂: 腹膜線維化における Matrix metalloproteinase (MMP)-1 の役割について 第 11 回日本腹膜透析研究会 (2005.10.29-30 岡山)

Abe, K., Miyazaki, M., Obata, Y., Taguchi, T., Koji, T., Tabata, T., Kohno, S.: Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) enhances the fibrotic area in chlorhexidine gluconate induced peritoneal fibrosis model in mice. American Society of Nephrology The 38th Annual Renal Week Meeting (2005.11.10-13 Philadelphia)

丸井 晃, 廣瀬圭一, 新井善雄, 黄 玉紅, 兼松明宏, 洞井和彦, 池田 義, 田畑泰彦, 米田正始: 生体吸収性材料を応用した血管新生療法 —安全性, 遠隔成績の向上を目指して—. 第 35 回日本心臓血管外科学会総会 (2005.2.25 浜松)

Marui A, Hirose K, Arai Y, Huang Y, Doi K, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M. Basic fibroblast growth factor (bFGF) released from biodegradable gelatin hydrogel is protected from advanced glycation in diabetic limb ischemia. The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2005.3.19 Yokohama)

丸井 晃, 田畑泰彦, 岩倉 篤, 洞井和彦, 廣瀬圭一, 新井善雄, 黄 玉紅, 池田 義, 米田正始: 生体吸収性材料による bFGF, HGF 徐放を応用した肺高血圧症治療 —肺移植・心肺移植に代わる新たなストラテジーへ—. 第 41 回日本小児循環器学会シンポジウム (2005.7.7 東京)

廣瀬圭一, 丸井 晃, 新井善雄, 阪口仁寿, 黄 玉紅, BIR Shyamal Chandra, 洞井和彦, 池田義, 田畑泰彦, 米田正始: 虚血肢に対する血管新生治療におけるセロトニンブロッカー併用効果に関する実験的検討. 第 9 回近畿・北陸セロトニン研究会 (2005.3.12 大阪)

廣瀬圭一, 丸井 晃, 新井善雄, 阪口仁寿, 黄玉紅, BIR Shyamal Chandra, 野村卓正, 池田 義, 光山正雄, 田畑泰彦, 米田正始: 組織再生促進による新しいライン感染予防法. 第 26 回日本炎症再生医学会 (2005.7.12-

13 東京)

廣瀬圭一, 丸井 晃, 新井善雄, 阪口仁寿, 黄 玉紅, BIR Shyamal Chandra, 野村卓正, 池田 義, 光山正雄, 田畑泰彦, 米田正始: 局所感染に対する新しい予防・治療法. 第 105 回日本外科学会定期学術総会 (2005.5.11-13 名古屋)

Murata, M., Tazaki, J., Akazawa, T., Yamamoto, M., Tabata, Y., Arisue, M.: Biological properties of hydroxyapatite with natural and artificial pores. The 83th IADR (2005.3.9-12 Baltimore)

Tazaki, J., Akazawa, T., Murata, M., Yamamoto, M., Tabata, Y., Yoshimoto, R., Arisue, M.: BMP-2 dose-response and release studies in functionally graded hap. Asian BioCeramics Symposium 2005 (2005.10.1-3 Sapporo)

田崎純一, 村田勝, 吉本良太, 有末 眞, 赤澤敏之, 山本雅哉, 田畑泰彦, 菅野 亨: 生体模倣傾斜機能アパタイトの BMP-2 徐放特性と減量実験. 第 8 回生体関連セラミックス討論会 (2005.12.2-3 東京)

Tazaki, J., Akazawa, T., Murata, M., Yamamoto, M., Tabata, Y., Yoshimoto, R., Arisue, M.: BMP-2 dose-response and release studies in functionally graded hap. Bioceramics 18 (2005.12.5-8 Kyoto)

松本剛一, 李 宇錫, 大見 寧, 木下鞆彦, 櫛引俊宏, 田畑泰彦, 久保田英朗: VEGF RNAi による扁平上皮癌の遺伝子治療. 第 64 回日本癌学会総会 (2005.9.14-16 札幌)

佐藤文夫, 笠嶋快周, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: ウマの創傷治癒における細胞増殖因子徐放化ハイドロゲルの応用. 第 140 回日本獣医学会学術集会 (2005.9.29-10.2 鹿児島)

森野茂行, 鳥羽紀成, 高橋 充, 永安 武, 橋爪 聡, 松本桂太郎, 櫛引俊宏, 田畑泰彦, 荒木政人, 田尾裕之, 中村達雄: 肺気腫に対する FGF-2 の経気道的投与による呼吸機能 再生に関する検討. 日本炎症再生医学会 (2005.7.12-13 東京)

Kinoshita, Y., Ozono, S., Todoki, K., Fukuoka, S., Tsuzuki, E., Matsuo, M., Kushibiki, T., Tabata, Y.: Regeneration of mandibular continuity defects in dogs by the combination of bFGF-incorporated gelatin microspheres and autogenic particulate cancellous bone and marrow. 17th ICOMS (2005.8.29-9.2 Vienna)

塗々木和男, 木下鞆彦, 小園 知, 福岡真一, 藤田忠寛, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: 顎骨の Tissue Engineering-bFGF 含浸ゼラチン粒子と骨髄海綿骨細片を用いた成犬下顎骨再生実験. 第 59 回日本口腔科学会総会 (2005.4.21-22 徳島)

Haraguchi, T., Okada, K., Tabata, Y., Maniwa, Y., Okita, Y.: Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor from Gelatin Hydrogel Sheet Inhibits Neointimal Hyperplasia and Improves the Patency of Vein Graft in Rat. The 6th Annual Conference on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (2005.4.28-30 Washington, DC)

Haraguchi, T., Okada, K., Tabata, Y., Maniwa, Y., Okita, Y.: Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor from Gelatin Hydrogel Sheet Promotes the Optimal Arterialization and Increases the Blood Flow of Vein Graft in Rat. The American Heart Association Scientific Session (2005.11.13-16 Dallas)

Ishii, K., Yanase, K., Yoshihashi-Suzuki, S., Yamamoto, M., Chihara, K., Tabata, Y., Awazu, K.: FT-IR analysis of phosphorylation and laser-dephosphorylation process. Photonics WEST BIOS 2005 (2005.1.22-27 Sanjose)

石井克典, 柳瀬 薫, 鈴木-吉橋幸子, 山本雅哉, 千原國宏, 田畑泰彦, 栗津邦男: リン酸化的 FT-IR 解析とレーザー脱リン酸化的基礎的検討. レーザー学会学術講演会第 25 回年次大会 (2005.1.20-21 相模原)

石井克典, 柳瀬薫, 鈴木-吉橋幸子, 山本雅哉, 千原國宏, 田畑泰彦, 栗津邦男: リン酸化的非破壊計測とレーザー脱リン酸化による生体材料親和性制御. 第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1-2 大阪)

Ishii, K., Yanase, K., Yoshihashi-Suzuki, S., Yamamoto, M., Chihara, K., Tabata, Y., Awazu, K. : FT-IR analysis of phosphorylation and laser-dephosphorylation process. 6th Asian-Pacific Conference on Biomedical Engineering (2005.4.24-27 Tsukuba)

石井克典, 櫛引俊宏, 鈴木-吉橋幸子, 山本雅哉, 田畑泰彦, 栗津邦男: 赤外光による生体材料のバリデーション. レーザー学会第 338 回研究会; レーザー医学・生物学応用 (2005.8.27 東大阪)

Ishii, K., Kushibiki, T., Yoshihashi-Suzuki, S., Yamamoto, M., Tabata, Y., Awazu, K. : Laser-dephosphorylation using mid-infrared laser and the application for regenerative medicine. 16th World Congress of the International Society for Laser Surgery and Medicine (2005.9.7-10 Tokyo)

石井克典, 櫛引俊宏, 鈴木-吉橋幸子, 山本雅哉, 田畑泰彦, 栗津邦男: FT-IR による生体材料機能のバリデーション手法の開発. 生体医工学シンポジウム 2005 (2005.9.27-28 吹田)

田村悦代, 田畑泰彦, 楠山敏行, 福田宏之: 声帯内自家組織注入術における塩基性線維芽細胞増殖因子投与の効果について. 第 50 回日本音声言語医学会 (2005.10.27-28 横浜)

田村悦代, 福田宏之, 楠山敏行, 中川秀樹, 田畑泰彦: 声帯内自家組織注入術における術後経過に及ぼす影響因子の検討. 第 57 回日本気管食道科学会 (2005.11.17-18 京都)

Ito, J., Nakagawa, T., Kita, T., Endo, T., Tamura, T., Iwai, K., Matsuoka, Y., Okano, T., Tabata, Y., Ishihara, T., Higaki, M. : Local drug delivery to the cochlea by the biodegradable polymer and gel. 42nd Workshop on Inner Ear Biology (2005.9.18-20 Tübingen Germany)

Endo, T., Nakagawa, T., Kita, T., Iguchi, F., Kim, T.S., Tamura, T., Iwai, K., Tabata, Y., Ito, J. : Novel strategy for treatment of inner ear disease using a biodegradable gel. 5th International Symposium: Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders (2005.4.2-5 Los Angeles)

後藤正司, 井貝 仁, 三崎伯幸, 山本恭通, 横見瀬裕保, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: イヌ肺腫モデルにおける bFGF 徐放マイクロスフェア (bFGF-GMS) の肺動脈投与の影響. 第 21 回日本肺および心肺移植研究会 (2005.1.29 仙台)

後藤正司, 岡本 卓, 井貝 仁, 三崎伯幸, 山本恭通, 横見瀬裕保, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: イヌ肺気腫モデルにおける bFGF 徐放ゼラチンマイクロスフェア (bFGF-GMS) の肺動脈内投与の影響. 第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1 大阪)

後藤正司, 岡本 卓, 井貝 仁, 三崎伯幸, 中島 尊, 榊屋大輝, 劉 大革, 石川真也, 山本恭通, 黄 政龍, 横見瀬裕保, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: 徐放性サイトカインを用いた気管・気管軟骨および肺胞再生の試み. 日本呼吸器内視鏡学会 (2005.6.9 東京)

井貝 仁, 三崎伯幸, 後藤正司, 山本恭通, 横見瀬裕保, 岡本 卓, 田畑泰彦: bFGF 徐放性ゼラチンスポンジを用いた気管軟骨再生の実験. 第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1 大阪)

井貝 仁, 三崎伯幸, 後藤正司, 山本恭通, 黄 政龍, 横見瀬裕保, 岡本 卓, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: イヌ肺気腫モデルにおける bFGF 徐放ゼラチンマイクロスフェア (bFGF-GMS) の肺動脈投与の影響. 第 22 回日本呼吸器外科学会総会 (2005.6.2-4 京都)

井貝 仁, 三崎伯幸, 後藤正司, 山本恭通, 横見瀬裕保, 岡本 卓, 山本雅哉, 田畑泰彦: Bone morphogenetic protein (BMP) -2 徐放ゼラチンスポンジによる気管軟骨再生の研究. 第 26 回日本炎症・再生医学会 (2005.7.12 東京)

井貝 仁, 後藤正司, 山本恭通, 横見瀬裕保, 三崎伯幸, 岡本 卓, 山本雅哉, 田畑泰彦: Basic fibroblast growth

factor (bFGF) の徐放による気管軟骨再生の研究. 第 58 回日本胸部外科学会総会 (2005.10.7 岡山)

井貝 仁, 張 性洙, 後藤正司, 山本恭通, 横見瀬裕保, 山本雅哉, 田畑泰彦: Bone morphogenetic protein (BMP)-2 徐放ゼラチンスポンジによる気管軟骨再生の研究. 第 43 回日本人工臓器学会大会 (2005.12.2 東京)

三崎伯幸, 井貝 仁, 後藤正司, 山本恭通, 横見瀬裕保, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: FGF 徐放ゼラチン (FGF Gel) とポリ乳酸カプロラクトン共重合体 (PLA co CL) による肺全摘後縦隔偏位予防の試み. 第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1 大阪)

Yamamoto, Y., Igai, H., Gotoh, M., Tabata, Y., Yokomise, H. : Regeneration of canine tracheal cartilage by slow release of growth factor from gelatin sponge. ESAO European Society for Artificial Organs XXXII Congress & IFAO ; International Federation for Artificial Organs (2005.10.5-8 Bologna Italy)

張 性洙, 井貝 仁, 後藤正司, 山本恭通, 横見瀬裕保, 櫛引俊宏, 田畑泰彦: ポリ乳酸カプロラクトン共重合体 (PLA-C) を足場とした胸腔内への自己組織再生に関する研究. 第 43 回日本人工臓器学会大会 (2005.12.2 東京)

Morimoto, K., Chono, S., Seki, T., Tabata, Y. : Novel injectable cationic microspheres based on aminated gelatin for prolonged action of insulin. 5th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference (2005.5.8-11 Hakone)

Morimoto, K., Chono, S., Seki, T., Tabata, Y. : Novel injectable cationic microspheres based on aminated gelatin for prolonged action of insulin. 8th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems (2005.12.18-23 Hawaii)

2) 講演・シンポジウム

田畑泰彦: 再生医療. 「第 3 期大阪バイオビジネススクール」 (2005.1.15 大阪)

田畑泰彦: 生体組織工学を利用した心・血管領域の再生医療の現状と展望. 「第 12 回東海セロトニン研究会」 (2005.1.22 名古屋)

田畑泰彦: ティッシュエンジニアリングを用いた再生医療の実践と展望. 「ME フォーラム 2005 「未来をひらく医用生体工学」」 (2005.1.24 東京)

田畑泰彦: 再生医療を支える生体組織工学の最前線. 「日本麻酔科学会関東甲信越地方群馬支部会 第 8 回研究会」 (2005.1.29 前橋)

田畑泰彦: 命を守る化学素材. 「平成 16 年度化学への招待高等学校出前講演会」 (2005.1.31 京都)

田畑泰彦: Significant role of cell scaffolding and DDS technologies in tissue regeneration : tissue engineering strategies. 「インターフェイス口腔健康科学国際シンポジウム」 (2005.2.3 仙台)

田畑泰彦: ここまで進んだ再生医療ー生体組織工学の最前線ー. 「日本皮膚科学会東北 6 県合同地方会」 (2005.2.5-6 仙台)

田畑泰彦: 新材料開発がどのような形で先端医療を支えているのか?. 「近畿化学会フロンティア材料セミナー」 (2005.2.9 大阪)

田畑泰彦: ここまで進んだ再生医療の実践ーそれを支える生体組織工学ー. 「第 68 回日本皮膚科学会東京支部学術大会教育セミナー」 (2005.2.19 東京)

田畑泰彦: ティッシュエンジニアリングを基盤とした再生医療の実践. 「岡山大学医学部再生医療セミナー」 (2005.3.16 岡山)

田畑泰彦: 先端医療における基礎研究から臨床研究への道. 「第 2 回産学連携セミナー」 (2005.3.29 京都)

田畑泰彦：自己修復能を高めることでからだのしくみはよみがえるのか？～再生医療の実現に必要な工学技術の最前線～。「第 511 回（平成 17 年 4 月度）大阪一水会例会次第」（2005.4.6 大阪）

Tabata, Y. : Controlled release system of growth factors for tissue engineering. 「King Chulalongkorn Medical Hospital special seminar」(2005.4.20-21 Thailand)

田畑泰彦：生体組織工学と再生医療。「第 104 回日本皮膚科学会総会」(2005.4.22-23 横浜)

田畑泰彦：再生医療を支える生体組織工学の最前線—バイオマテリアルの重要性—。「第 44 回日本生体医工学会大会」(2005.4.25-27 つくば)

田畑泰彦：日本の再生医療の現状と運動器再生医療に用いる scaffold. 「第 78 回日本整形外科学会学術総会シンポジウム」(2005.5.11-12 横浜)

Tabata, Y. : Important Role of Tissue Engineering in Regenerative Medical Therapy. 「2005 Trilateral Stem Cell Meeting -Japan, France, Pittsburgh—」(2005.5.13 神戸)

田畑泰彦：Tissue Engineering を用いた再生医療の現状と将来の方向性。「第 43 回日本口腔外科学会 第 31 回（社）日本口腔外科学会 北日本地方会」(2005.5.20 札幌)

Tabata, Y. : Tissue engineering based on drug delivery system of growth factor. 「2nd International Conference on Tissue Engineering」(2005.5.22-27 Crete, Greece)

田畑泰彦：細胞増殖因子の徐放化システムのデザイン。「第 1 回 DDS 再生医療連絡勉強会」(2005.6.4 京都)

田畑泰彦：再生医療を支える生体組織工学の最前線。「第 36 回日本口腔外科学会近畿地方会」(2005.6.11 滋賀)

田畑泰彦：生体吸収性材料を利用した生体組織の再生誘導法。「第 2 回泌尿器科再建再生研究会」(2005.6.18 東京)

Tabata, Y. : Angiogenesis for tissue regenerative medical therapy with biomaterials and drug delivery system. 「Immediate Challenges of Craniofacial Tissue Regeneration」(2005.6.20-23 Nantes)

田畑泰彦：生体組織工学をベースとした再生医療の現実—バイオマテリアルを利用した組織再生誘導のための場の創製—。「第 29 回心臓薬理研究会」(2005.7.1 名古屋)

Tabata, Y. : Tissue Regeneration Therapy by DDS Technology of Growth Factor And Gene. 「International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT) 2005」(2005.7.3-8 Singapore)

田畑泰彦：生体組織の再生誘導治療の実際と展望—Tissue Engineering の重要性—。「第 2 回群馬創傷治癒フォーラム」(2005.7.15 前橋)

田畑泰彦：再生医療に関する現状と展望。「第 18 回磁気共鳴代謝研究会」(2005.7.16. 京都)

田畑泰彦：塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 徐放システムを用いた再生療法。「第 9 回心筋・血管新生療法研究会」(2005.7.22 東京)

Tabata, Y. : Strategies for Tissue Regeneration and Vascularization Based on Release Technology of Growth Factor. 「Advances in Tissue Engineering-2005」(2005.8.10-13 Houston)

田畑泰彦：生体吸収性材料を用いた先端医療。株式会社日東電工スペシャルセミナー (2005.8.17 大阪)

Tabata, Y. : Mechanism of controlled release for medical applications. 「King Chulalongkorn Medical Hospital special seminar」(2005.9.6-7 Thailand)

Tabata, Y. : Significance of Tissue Engineering in Regenerative Medical Therapy. 再生医療に関する第 1 回日独合同カンファレンス (2005.9.8-9 津)

田畑泰彦：新規材料の医療への展開。学術会議材料連合講演会 (2005.9.16 京都)

田畑泰彦：ここまで進んだ再生医療—自然治癒力を高める医療技術の最前線—。「宇治市民大学～市民生活コース」

(2005.9.17 宇治)

田畑泰彦：再生医療材料の展開，「口腔顔面頭蓋再生研究国際シンポジウム」(2005.9.18 岡山)

田畑泰彦：サイボーグ研究と医療現場，「ファイザー株式会社講演会」(2005.9.21 知多郡)

田畑泰彦：人にやさしい治療工学，「大阪工業大学工学部改組記念シンポジウム」(2005.10.4 大阪)

田畑泰彦：再生医療を実現させる scaffolding と DDS の再生医工学，「第 64 回社団法人日本脳神経外科学会総会」
(2005.10.5-7 横浜)

Tabata, Y. : Importance of biomaterials and drug delivery system in regenerative medical therapy. 「72nd International Center for Young Scientist seminar」(2005.10.7 Tsukuba)

田畑泰彦：再生医療を実現する生体組織工学の実際と形成外科領域への展開，「第 46 回日本形成外科学会中部支部東海地方会」(2005.10.8 名古屋)

田畑泰彦：再生医療を支える Tissue Engineering の最前線，「第 14 回日本形成外科学会基礎学術集会イブニングセミナー」(2005.10.14 東京)

田畑泰彦：再生医療を実現する生体組織工学の実際—細胞に再生誘導の場を与える医工学技術，方法論—，「第 14 回日本形成外科学会基礎学術集会」(2005.10.14-15 東京)

Tabata, Y. : DDS and tissue engineering. 「Zhejiang University special seminar」(2005.10.20 Hangzhou)

Tabata, Y. : Frontier of regenerative medical therapy based on technology of cell scaffolding and drug delivery system. 「The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International」(2005.10.22-25 Shanghai)

田畑泰彦：再生医療を支える Tissue Engineering の最前線，「第 6 回心血管再生医学研究会」(2005.10.29 京都)

田畑泰彦：再生医療の現状と未来，愛知学院大学歯学会主催「学生のための講演会」(2005.11.5 名古屋)

田畑泰彦：再生医療の実際と展望—再生誘導能力を高める医工学技術—，「関西バイオの未来を考える会」
(2005.11.11 大阪)

田畑泰彦：再生医療における技術の権利化と実用化，「社団法人 日本機械学会関西支部 ステップアップ・セミナー 2005」(2005.11.18 大阪)

田畑泰彦：遺伝子導入試薬としてのカチオン化多糖誘導体の合成，「第 63 回日本化学繊維研究所講演会」(2005.11.18 京都)

田畑泰彦：再生医療を支える生体吸収性材料に必要な化学技術，「関西地区 ST/GSC ロードマップ討論会」
(2005.11.22 大阪)

田畑泰彦：再生医学と生体組織工学，「財団法人神奈川科学技術アカデミー教育講座」(2005.11.25 横浜)

Tabata, Y. : Role and prospective of polymer biomaterials in frontier medical therapy. 「The 53rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR)」(2005.11.26 Okayama)

田畑泰彦：Tissue Engineering 技術を活用した再生医療の現実と展望，「第 19 回阪神心臓セミナー」(2005.12.3 大阪)

田畑泰彦：生体組織工学と再生医療，「腎再生医療学術講演会」(2005.12.8 長崎)

田畑泰彦：ここまで進んだ再生医療「自然治癒力を高める世界最先端医療技術」自己の再生誘導能により，血管・骨・神経・皮膚などの生体組織を蘇らせる，「芦屋市民講座」(2005.12.10 芦屋)

Tabata, Y. : Significant role of naturally occurring materials in drug delivery technology for tissue regeneration therapy. 「International Chemical Congress of Pacific Basin Societies」(2005.12.18 Hawaii)



組織修復材料学分野 Department of Reporative Materials

分野主任 教授 岩田 博夫

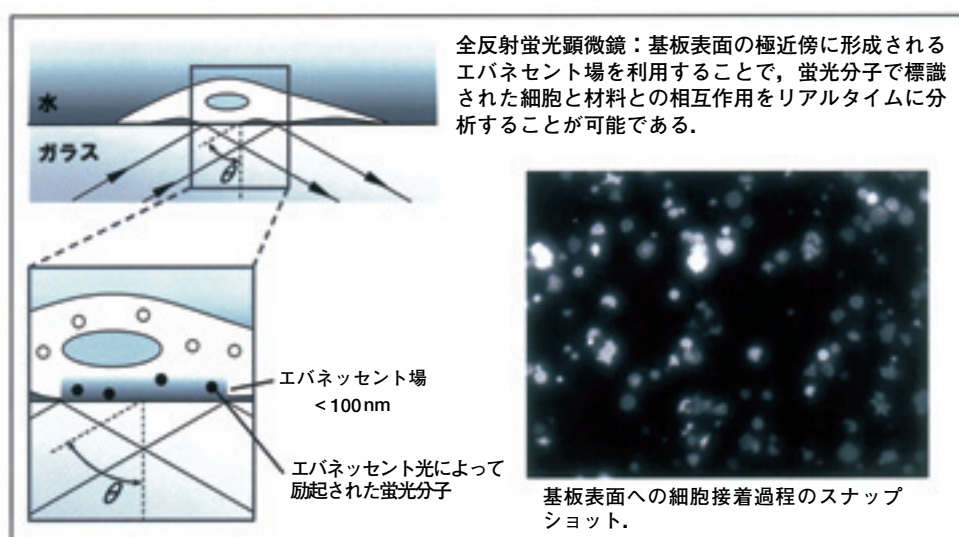
Prof. Hiroo Iwata

【研究概要】

当研究分野では、病気や怪我の治療に役立つ人工材料を創り出すための研究を行っています。それらの材料は人体の中で機能したり、体外での細胞操作・分析に効力を発揮するなど、その目的と機能は様々です。当研究分野では主に、高分子を中心とする有機材料、また、細胞や生体分子を制御・分析するための様々な技術を駆使することで、それらの研究を進めています。このような研究を通じて、再生医療や低侵襲手術のような高度先進医療に貢献したいと考えています。

1. 材料—生体システム間相互作用

医用材料は、細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面で起こる分子間相互作用を通して機能を発揮します。そのため、タンパク質吸着や細胞接着のような材料—生体システム間相互作用を詳細に理解し、また、それらを厳密に制御することは重要な課題です。当研究分野では、表面プラズモン共鳴分析装置、全反射蛍光顕微鏡、走査型共焦点レーザー顕微鏡などの光学的手法を用いてこれらの課題に取り組んでいます。



2. 組織工学用材料

細胞移植による臓臓や中枢神経の再生医療に期待が寄せられています。しかし、移植された細胞の機能を高く維持するには、細胞がレシピエントの免疫系からの攻撃に打ち勝たなければなりません。これには高分子ハイドロゲルによる細胞のカプセル化が有効です。当研究分野では、さらに優れた機能をもつカプセル化材料を生み出すため、材料化学的観点から研究を行っています。

3. 移植細胞プロセッシング技術

再生医療の実現にとって、移植用の細胞をどのように調製するかという問題は、もっとも重要な課題の一つです。当研究分野では、ドーパミン作動性神経細胞、インスリン産生細胞、造血幹細胞、神経前駆細胞などを、安全かつ

高効率に作り出すための細胞分化制御・増幅技術の開発に取り組んでいます。とくに、細胞外マトリックスや細胞増殖因子のような生体分子、あるいは、ストローマ細胞のような異種の細胞を利用して、細胞の分化・増殖に適した人工環境を作り出したいと考えています。

4. 細胞アレイ

多種類の生体分子の機能を迅速に分析するための細胞アレイの開発を行っています。マイクロパターンをもつ基板材料を利用して多種類の DNA、あるいは、RNA、タンパク質、生細胞などを配列固定し、それらを同時に細胞に作用させることで、固定された分子の生物学的機能を並列分析することが可能です。また、細胞の形態や培養液の循環を厳密に制御する技術と組み合わせ、新たなバイオアッセイ法へと展開する試みも行っています。細胞アレイ分析法は、生物学研究のみならず、再生医療、医薬品開発、臨床検査などの様々な分野に大きなインパクトを与えるものと期待されます。

5. ナノバイオマテリアル

ナノメートルスケールの構造特性をもつ生体材料を用いて、細胞の機能を高度に制御したいと考えています。そのような材料の創出には、遺伝子工学の技術によって合目的にデザインされた人工タンパク質分子を、分子認識や自己組織化の過程を経てボトムアップ式に構築する方法を採用します。細胞機能の精密な制御が可能な生体材料は、組織工学に大きな進歩をもたらすものと期待しています。

Modern medical treatments have been developed from not only modern pharmaceutical sciences and molecular biology, but also biomedical engineering. The role of researchers whose background is engineering will be to become more important in such boundary research area in future. We aim to train students from the graduate school of engineering for the biomedical engineer through the researches. Research subjects of our department are listed below :

Cell culture substrates for regenerative medicine

Cells and extracellular matrixes are important raw materials for regenerative medicine. In recent years, many research groups have devoted enormous efforts to establish in vitro culture conditions in which stem cells, such as ES cells and tissue stem cells, differentiate into various functional cells. Those cells are expected to be very useful for treatment of various diseases. Many kinds of stromal cells have been used to differentiate stem cells to functional cells. However, most of stromal cells preferentially used are derived from mice. Some authorities who are in charge of regulatory issue have pointed out the difficulty to rule out the possibility that retrovirus incorporated in mouse gene will be activated and transferred to stem cells and functional cells derived from stem cells. One of our research activities is focused on the development of stromal cell free culture systems used for the induction of ES cells to various functional cells. ES cells cultured on the substrate, onto which bioactive molecules isolated from stromal cells, are immobilized effectively differentiated to dopaminergic neurons.

Conventional cell culture substrates are not always suitable for cells used for regenerative medicine. Neurons differentiated from ES cells in vitro are very difficult to be collected from a cell culture flask without deterioration of cell functions, because long axons from neurons are easily damaged during detachment of neural cells from the cell culture substrate. Cell sheets but not single cells are needed in some instance, such as regeneration of a skin and a mucous membrane. We have been examining a film of cellulose derivatives for a cell culture substrate. Cells cultured on it are removed by cellulose-degrading enzyme, cellulase, without damaging cells on the substrate.

Bioartificial organs

Bioartificial Liver : Liver is a unique organ that has a strong potential for regeneration. Even after the liver is severely damaged, its regeneration can be expected if the patient is appropriately supported by a medical device for a certain time. A bioartificial liver that contains a large number of living hepatocytes is the most promising device for liver support. We prepare a bioartificial liver by inoculating ten billion porcine hepatocytes into a hollow fiber module. Hepatocytes in hollow fibers formed the firm aggregate of a noodle shape after one day culture. The metabolic functions of the bioartificial liver were evaluated by loading several chemicals. Our bioartificial liver maintained about 1/20 of the metabolic function of the normal adult human liver for more than 10 days.

Bioartificial pancreas : Islets of Langerhans have been transplanted to treat insulin-dependent diabetes patients. Adult pancreatic β cells are known to have a poor growth capacity. Islets containing β cells from cadaver donors or animals should be employed. In bioartificial pancreas, islets are encapsulated into a semi-permeable membrane and then implanted into the diabetic patients to protect them from immune rejection. The semi-permeable membrane permits permeation of oxygen and nutrient which are necessary for islet survival, but prohibits contact of islet cells with components of the host immune system. We encapsulated islets into agarose-based microbeads and induced normalization of blood glucose levels of diabetic recipient mice by implanting 1000 microencapsulated hamster islets into the peritoneal cavity.

Medical devices for least invasive surgery

Endovascular surgery is recognized as one of the strategies for the treatment of various neuro-vascular diseases such as cerebral or spinal arteriovenous malformations, dural arteriovenous fistulas and cerebral aneurysms. In this method, a microcatheter is advanced into or close to a lesion and then the lesion is treated by various methods, such as embolization and stenting. It is not so invasive and thus is accepted as an attractive therapy making up conventional surgical techniques. For more than 20 years we have been working on the development of new devices, such as catheters with higher performance, effective embolic materials, and smart stents.

Cell chips for high-through-put screening

Transfectional array : Functional characterization of human genes may be one of the most challengeable tasks in the post-genome era. Due to a huge number of novel genes discovered in genomics, high-throughput methods are required to express or silence in parallel thousands of genes in living cells. The objective of our study is to fabricate transfectional arrays through micropatterning of self-assembled monolayers on a gold substrate and the subsequent site-specific spotting of different expression vectors or short interfering RNAs.

Antibody array : Recent progress in stem cell research provides us with promising options of cell sources for use in tissue engineering. However, insufficient knowledge about specific surface antigens expressed on most of stem cells limits their application in regenerative medicine. To solve this problem, we developed a high-throughput analytical method for typing multiple membrane proteins. Our method is based on solid-phase cytometry using an antibody microarray prepared on a micropatterned alkanethiol monolayer.

The highly-integrated cell arrays prepared by patterning self-assembled monolayers will provide promising platforms for the cell-based high-throughput functional analysis, where live cells are used to screen massively thousands of drugs, proteins, and genes in parallel.

Surface chemistry for biomedical materials

Protein adsorption and complement activation are involved in the initial reactions against man-made materials with living bodies. It is necessary to elucidate these mechanism in relation to the surface properties so as to rationally design biocompatible surfaces of synthetic implants. Most of information on protein adsorption and complement activation by artificial polymeric materials has been accumulated from studies with polymeric materials. However, polymer surfaces could not be assumed rigid and immobile at equilibrium. The polymer molecules in the vicinity of the surface or interface would exhibit motion and relaxation in response to the different interfacial environment. And thus it is difficult to prepare model surfaces using polymeric materials for studies of the complement activation. Self-assembled monolayers of alkanethiols formed on a gold thin film give well-defined model surfaces for studies on interfacial phenomena and intermolecular interactions. The surface plasmon resonance technique can be applied to analyze the interfacial phenomena under water. We have been studying protein adsorption, complement activation, and cell adhesion on well-defined surfaces made of self-assembled monolayers using the surface plasmon resonance technique.

Nanobiomaterials

The fabrication of nanostructured materials is a central challenge in nanotechnology. Instead of the conventional methods based on photolithography, various bottom-up strategies have been examined for constructing nanoscale molecular architecture using self-assembling biomacromolecules including proteins. However, few cases were reported to date on the use of genetic engineering for designing building blocks for nanomaterial preparations. Our strategy for constructing nanostructures is unique in using chimeric proteins that are designed to recognize specific sequences spontaneously arrayed on an ordered template made of self-assembling secondary proteins. It is expected that the ordered array of ligand-binding sites on the template facilitates the assembly of chimeric proteins with nanoscale spatial precision.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Kato, K., Sato, H., Iwata, H. : Immobilization of histidine-tagged recombinant proteins onto micropatterned surfaces for cell-based functional assays. *Langmuir* **21** : 7071-7075 (2005) . (web release date : June 29, 2005)
- Murakami, Y., Iwata, H., Kitano, E., Kitamura, H., Ikada, Y. : Interaction of poly(styrene sulfonic acid) with the alternative pathway of the serum complement system. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **16**(3) : 381-395(2005)
- Murakami, Y., Iwata, H., Kitano, E., Kitamura, H., Ikada, Y. : Interaction of poly(styrene sulfonic acid) with the classical pathway of the serum complement system. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **16**(6) : 685-697(2005)
- Ko, I.-K., Kato, K., Iwata, H. : Antibody microarray for correlating cell phenotype with surface marker. *Biomaterials* **26** : 687-696(2005)
- Ko, I.-K., Kato, K., Iwata, H. : Parallel analysis of multiple surface markers expressed on rat neural stem cells using antibody microarrays. *Biomaterials* **26** : 4882-4891(2005)
- Ko, I.-K., Kato, K., Iwata, H. : A thin carboxymethyl cellulose culture substrate for the cellulase-induced harvesting of an endothelial cell sheet. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **16** : 1277-1292 (2005).

- Yamazoe, H, Murakami, Y, Mizuseki, K, Sasai, Y, Iwata, H : Collection of neural inducing factors from PA6 cells using heparin solution and their immobilization on plastic culture dishes for the induction of neurons from embryonic stem cells. *Biomaterials* **26**, : 5746-5754 (2005)
- Yamazoe, H., Iwata, H. : Cell Microarray for screening feeder cells for differentiation of embryonic stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* **100** : 292-296 (2005)
- Ymazoe, H., Kobori, M, Murakami, Y., Yano, K., Satoh, M., Mizuseki, K., Sasai, Y., Iwata, H. : One step induction of neurons from mouse embryonic stem cells in serum-free media containing vitamin B12 and heparin. *Cell Transplantation*, in press.
- Arima, Y., Ishii, R., Hirata, I., Iwata, H. : Development of surface plasmon resonance imaging apparatus for high-throughput study on protein-surface interactions, *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, in press
- Yamauchi, F., Kato, K., Iwata, H. : Layer-by-layer assembly of poly(ethyleneimine) and plasmid DNA onto transparent indium-tin oxide electrodes for temporally and spatially specific gene transfer. *Langumir* **21** : 8360-8367 (2005).
- Fujita, S., Ueda, Y., Ko, IK., Paek, HJ., Sajiki, T., Ikai, I., Yamaoka, Y., Ikada, Y., Iwata, H. : Functional evaluation of bioartificial liver using RT-PCR. *Biomed. Mater. Eng.* **15**(3) : 211-218 (2005)
- Ohyama, T., Nishide, T., Iwata, H., Sato, H., Toda, M., Toma, N., Tak,i W. : Immobilization of basic fibroblast growth factor on a platinum microcoil to enhance tissue organization in intracranial aneurysms. *J. Neurosurg.* **102** : 109-115 (2005)

2) 著 書

- 岩田博夫：高分子先端材料 One Point 3：バイオマテリアル（高分子学会編集，共立出版，東京），（2005）
- 加藤功一，材料表面への生体組織結合能の付与．表面・界面工学体系（本多健一編，テクノシステム，東京）205-207（2005）
- 佐藤秀樹，岩田博夫：「バイオ人工臓臓」先端医療シリーズ 37．人工臓器，「人工臓器・再生医療の最先端」，先端医療技術研究所，220-224（2005）
- 佐藤秀樹，伊比井崇向，岩田博夫：「人工臓臓」ソフトナノテクノロジー—バイオマテリアル革命—，シーエムシー出版，104-115（2005）
- 山添泰宗，岩田博夫：マウス ES 細胞からドーパミン産生神経細胞の分化誘導．「ティッシュエンジニアリング 2005」，田畑泰彦，岡野光夫編，第 2 章 11（2005）

3) 総 説

- 加藤功一：細胞チップの設計と生医学分野への応用．生体材料，**23** : 30-36（2005）
- 山内文生，加藤功一，岩田博夫：「ナノ制御表面創生と細胞アレイ：遺伝子導入アレイ」ーゲノム配列の解読から機能の解析へー．*Bio Clinica*, **20** : 59-62（2005）
- 有馬祐介，岩田博夫：エバネッセント場を利用した細胞—材料表面間の相互作用解析．日本レーザー医学会誌，**26** : 38-44（2005）
- 藤田聡，岩田博夫：人工肝臓．ナノバイオ事典（監修：山根恒夫・松永是，テクノシステム），（in press）
- 藤田聡，岩田博夫：再生医療．Future textiles 進化するテクニカル・テキスタイル（監修：堀照夫，繊維社），（in press）

安藤知子・金田成弘・岩田博夫：臍島移植における免疫隔離膜の応用．今日の移植（日本医学館），**18**(4)：418-423
(2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

岩田博夫, 有馬祐介：Cell based assay のプラットフォーム作り, 第 66 回応用物理学会学術講演会 (2005.9.7-11 徳島)

Iwata, H. : Bioartificial pancreas -membrane and insulin producing cells from ES cells. The China-Japan Mini-Symposium 2005 on Regenerative Medicine (2005.10.21, Shanghai)

岩田博夫：バイオ人工臓臓の開発．第 43 回日本人工臓器学会大会 (2005. 12.1-2 東京)

加藤功一, 岩田博夫：細胞増殖因子キメラを固定化した基材表面における神経幹細胞の分化．第 4 回日本再生医療学会大会 (2005.3.1-2 大阪)

加藤功一, 中路 正, 佐藤秀樹, 岩田博夫：ナノバイオテクノロジーの現状と我々の取り組み．第 126 回ポバール会 (2005.7.2 京都)

加藤功一, 石室俊成, 有馬祐介, 平田伊佐雄, 岩田博夫：表面プラズモン共鳴イメージング装置を用いた白血球表面マーカーの分析．第 34 回医用高分子シンポジウム (2005.8.1-2 東京)

加藤功一, 石室俊成, 有馬祐介, 平田伊佐雄, 岩田博夫：表面プラズモン共鳴イメージング装置による細胞表面マーカーの検出．第 49 回日本学術会議材料研究連合講演会 (2005.9.15-16 京都)

加藤功一, 中路 正, 佐藤秀樹, 岩田博夫：上皮細胞増殖因子を配向固定した基材表面による神経幹細胞の分化制御．第 54 回高分子討論会 (2005.9.20-22 山形)

加藤功一, 中路 正, 佐藤秀樹, 岩田博夫：キメラタンパク質を利用したナノバイオマテリアル設計の試み．第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

石室俊成, 加藤功一, 岩田博夫：平板セル型抗体アレイを用いた細胞膜抗原のパラレル分析．第 4 回日本再生医療学会大会 (2005.3.1-2 大阪)

中島雅文, 高 寅甲, 加藤功一, 岩田博夫：細胞マイクロアレイ法による神経幹細胞—マトリックス相互作用のパラレル分析．第 4 回日本再生医療学会大会 (2005.3.1-2 大阪)

Nakajima, M., Kato, K., Iwata, H. : Protein microarrays for parallel assays of neural stem cell differentiation. 3rd KIPS-NIST Symposium on Polymer Science (2005. 5.19-20 Kyoto)

佐藤秀樹, 伊比井崇向, 末盛博文, 中辻憲夫, 岩田博夫：カニクイザル ES 細胞からインスリン産生細胞への分化誘導．第 4 回日本再生医療学会総会 (2005. 3. 1-2 大阪)

佐藤秀樹, 三浦 傑, 山口歌奈子, 末盛博文, 中辻憲夫, 宮崎純一, 岩田博夫：Pdx1 遺伝子を導入したカニクイザル ES 細胞からインスリン産生細胞への分化誘導．第 28 回日本分子生物学会総会 (2005. 12. 7-10 福岡)

山添泰宗, 岩田博夫：中空糸への ES 細胞の封入とドーパミン産生神経細胞への分化誘導．第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1 大阪)

山添泰宗, 岩田博夫：ES 細胞からドーパミン産生神経細胞への分化誘導とその中空糸への封入．第 34 回医用高分子シンポジウム (2005.8.1 東京)

堀川 毅, 有馬祐介, 岩田博夫：全反射蛍光顕微鏡を用いた自己組織化単分子膜への HeLa 細胞接着挙動の観察．第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1-2 大阪)

Arima, Y., Iwata, H. : Time-lapse observation of cell adhesion by evanescent field imaging technique. Surface and Interface in Nano-bioelectronics (Biotronics2005) (2005.3.3-7 岡崎)

有馬祐介・堀川 毅・岩田博夫：フィブロネクチン／アルブミン混合吸着表面への細胞接着．第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)

Arima, Y., Iwata, H. : Cell adhesion on self-assembled alkanethiol monolayers with various functional groups. International Symposium on Surface Science and Nanotechnology (2005. 11.14-17 埼玉)

Arima, Y., Ishii, R., Hirata, I., Iwata, H. : Development of surface plasmon resonance imaging apparatus for high-throughput study on protein-surface interactions. International Symposium on Surface Science and Nanotechnology (2005.11.14-17 Saitama)

Yamauchi, F., Kato, K., Iwata, H. : Electric pulse-triggered gene transfer into adherent cells on a DNA-loaded electrode. Molecule-Based Information Transmission and Reception-Application of Membrane Protein Biofunction (MB-ITR2005) , Satellite Symposium Surface and Interface in Nano-Bioelectronics (Bioelectronics2005) (2005. 3. 3-7 Okazaki)

山内文生, 加藤功一, 岡田光浩, ラルス・マーチンヤークト, 岩田博夫：ES 細胞を用いた遺伝子機能解析のためのトランスフェクショナルアレイ：血管細胞分化制御関連遺伝子のスクリーニング, 第 54 回高分子討論会 (2005.9.24-26 山形)

山内文生, 加藤功一, 岡田光浩, ラルス・マーチンヤークト, 岩田博夫：トランスフェクショナルアレイを用いた ES 細胞分化制御関連遺伝子のスクリーニング, 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28,29 京都)

山内文生, 加藤功一, 岡田光浩, ラルス・マーチンヤークト, 岩田博夫：トランスフェクショナルアレイによる ES 細胞分化制御遺伝子のスクリーニング, 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005.12.7-10 福岡)

Fujita, S., Kitahara, N., T Tsuji, T., Toguchida, J., Iwata, H. : Hematopoiesis supporting ability of immortalized mesenchymal stem cells. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25, Shanghai)

Toda, M., Kitazawa, T., Hirata, I., Hirano, Y., Iwata, H. : Interaction of serum complement with surfaces carrying amino groups studied with surface plasmon resonance. Molecule-Based Information Transmission and Reception-Application of Membrane Protein Biofunction (2005.3.3-7 Okazaki)

戸田満秋, 岩田博夫：表面にアミノ基を有する自己組織化膜での補体系活性化挙動の解析．第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)

藤本裕之, 吉迫 智, 加藤功一, 岩田博夫：siRNA のパラレル導入が可能な細胞マイクロアレイの作製．第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1-2 大阪)

藤本裕之, 加藤功一, 岩田博夫：遺伝子のハイスループット機能解析を目指した RNA 干渉誘導アレイの作製．第 54 回高分子学会年次大会 (2005.5.25-27 横浜)

北原七恵, 藤田 聡, 辻 孝, 戸口田淳也, 井田憲司, 杉並 洋, 岩田博夫：ヒト不死化間葉系幹細胞による造血前駆細胞の効率的な増幅．第 4 回日本再生医療学会総会, (2005.3.2 大阪)

北原七恵, 藤田 聡, 辻 孝, 戸口田淳也, 井田憲司, 杉並 洋, 岩田博夫：血液前駆細胞とカプセル化骨髓ストローマ細胞との共培養．第 27 回日本バイオマテリアル学会, (2005. 11. 28 京都)

Ando, T., Yamazoe, H., Moriyasu, K., Iwata, H. : Induction of dopamine releasing neurons from monkey ES cells in

agarose microcapsules, 8th TESI Annual Meeting (2005.10.22-25 Shanghai)

安藤知子, 山添泰宗, 森安健太, 岩田博夫: アガロースマイクロカプセル内でのサル ES 細胞からドーパミン産生細胞への分化誘導. 第 27 回日本バイオマテリアル学会 (2005.11-28-29 京都)

Miura, S., Teramura, Y., Iwata, H.: Surface modification of living cells using PEG-lipoids. 8th TESI Annual Meeting (2005.10.22-25 Shanghai)

三浦 傑, 寺村裕治, 岩田博夫: 新規カプセル化物質の合成とそのカプセル化能の検討. 第 27 回日本バイオマテリアル学会 (2005.11.28-29 京都)

宮崎寛子, 加藤功一, 溝口 明, 岩田博夫: 抗体マイクロパターンを用いた神経細胞の形態制御. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会 (2005.11.28-29 京都)

2) 講演・シンポジウム

岩田博夫: 血管内治療用デバイスに必要な素材と工夫—脳血管内治療医が知っておきたい物性の基礎知識—, 第 5 回名古屋脳神経血管内治療セミナー (2005. 10.15 名古屋)

Iwata, H.: Bioartificial pancreas. Membrane and insulin producing cells from ES cells, 37th ISTC Japan Workshop on Advanced Nanomaterials in Russia/CIS (2005. 12.13 Tsukuba)

Kato, K., Ko, I.-K., Yamauchi, F., Fujimoto, H., Nakajima, M., Yoshizako, S., Iwata, H.: Micropatterned surfaces for cell-based biomolecular screening, Harima International Forum on Smart Polymer and Smart Surface in Medicine and Industry (2005 1.31-2.1 Ako)

Kato, K.: Micropatterned surfaces for cell-based biomolecular screening, NSF/MEXT U.S.-Japan Young Scientists Symposium on Bionanotechnology (2005. 3. 8 USA)

加藤功一, 岩田博夫: 細胞アレイ, ヒューマンライフサイエンスフォーラム 2005 (2005.10.21 大阪)

Kato, K., Sato, H., Iwata, H.: Genetically engineered nanoarchitecture, MEXT/NSF Japan-U.S. Young Scientists Symposium on Bionanotechnology (2005.12. 9 Tokyo)

Arima, Y., Iwata, H.: Studies of cell adhesion behavior on self-assembled alkanethiol monolayers by evanescent wave methods. International Symposium of Center for Integrated Cell and Tissue Regulation—Laser Science for the Validation of Regenerative Medicine (2005.9.8 Tokyo)

再生統御学研究部門

発生分化研究分野

Department of Development and Differentiation

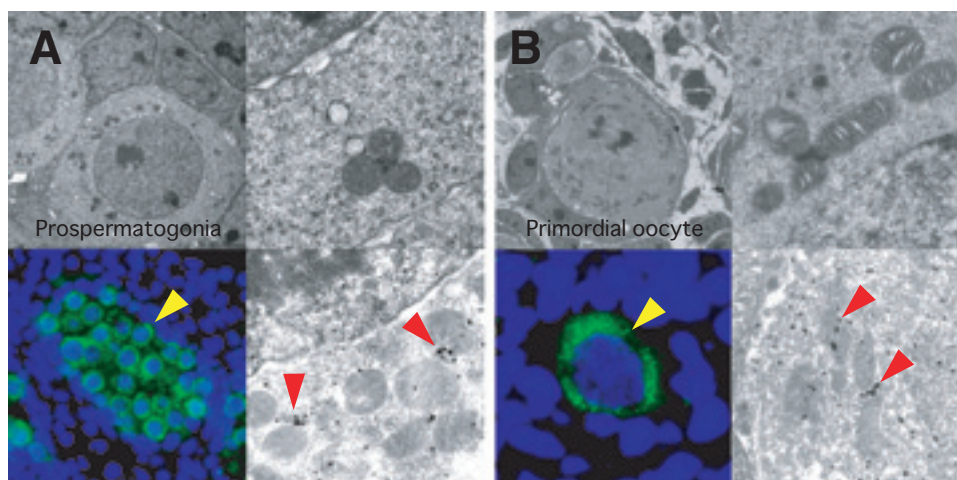
分野主任 中辻 憲夫

Prof. Norio Nakatsuji

【研究概要】

マウス生殖系列細胞の発生分化機構に関する研究

哺乳類の個体発生と世代間の連続は生殖細胞と胎仔多能性幹細胞の繰り返しにより成立しており、これら生殖系列細胞に内在する分子システムは各種体細胞系列が分岐する際の基底状態に相当すると考えられる。当研究グループはマウス生殖系列細胞の発生分化制御機構の解明に取り組んでおり、現在主に生殖細胞に特徴的に観察される生殖顆粒構造構成分子の同定、機能解析を進めている。これまでに Tudor ドメインの繰り返し構造を持つ TDRD1/MTR1, TDRD6, TDRD7/TRAP 蛋白質がいずれもマウス生殖顆粒に特異的に局在する事を明らかにした。また mRNA スプライシングに関与する snRNPs が生殖顆粒に局在し TDRD1 と複合体を形成する事、*Tdrd1* 遺伝子変異マウスは雄生殖細胞の成熟過程で分化異常を示す事、Tudor ドメイン単独で生殖顆粒への局在が可能であるがその過剰発現は生殖細胞の分化異常を引き起こす事、TDRD1, 6, 7 の細胞内局在が RNA ヘリケースである *Mvh* により制御される事、生殖顆粒構造はマウス卵母細胞の発生には必須では無い事等が明らかとなった。現在 TDRD 蛋白質群を分子プローブとして雄生殖顆粒構造の包括的な解析を進めている。また、未成熟精巣に対する生体内電気穿孔法を用いて雄生殖細胞の分化段階特異的な遺伝子機能獲得、抑制実験系を作出した。一方、胎仔生殖細胞の成体精巣への異時的移植実験により胎仔多能性幹細胞から分化直後の始原生殖細胞が雄生殖幹細胞への分化能を獲得しており、ゲノムインプリンティング消去の自律的なプログラムを持つ事が明らかとなった。



TDRD1 は雌雄生殖細胞 intermitochondrial cement/nuage の特異的な構成分子である。(A)胎仔前精原細胞、(B)第一卵母細胞。上段、電子顕微鏡観察像(左、弱拡大;右、強拡大)、下段左、抗 TDRD1 蛍光免疫染色像、下段右、抗 TDRD1 免疫電子顕微鏡像。

Mechanisms of development and differentiation of mammalian germ-line cells

The successive cycles between germ cells and pluripotent cells are fundamentals for ontogeny of individuals and continuity through generations in mammals. Mechanisms underlying the germ-line cells corresponds to basal states for the derivation of somatic cell lineages. Our research aim is to elucidate mechanisms regulating the development and differentiation of the germ-line, and we are currently focusing on specialized cytoplasmic structures called nuage or germ granules. We have shown that (1) TDRD1/MTR1, TDRD6 and TDRD7/TRAP proteins containing multiple Tudor domains specifically localize to mouse nuage, (2) spliceosomal complex snRNPs accumulate to nuage and form a complex with TDRD1, (3) mice homozygous for a targeted mutation of *Tdrd1* are male-sterile, (4) a single Tudor domain is sufficient for the protein localization to nuage, but its over-expression causes meiotic defect, (5) the localization of TDRD1, 6 and 7 to nuage is under the control of *Mvh* activity similar to the relationship between *Drosophila vasa* and tudor, and (6) nuage is not essential for oocyte development and fertility in mice. We are currently trying a more comprehensive analysis of nuage components in male germ cells. Other research projects include (1) development of in vivo electroporation conditions of premature testes that enable differentiation stage specific gain-of-function and loss-of-function experiments of spermatogenic genes in vivo, and (2) heterochronic transplantation experiments of primordial germ cells (PGCs) into postnatal testes, which showed that PGCs possess differentiation capacity comparable to postnatal spermatogenic stem cells and that erasure program of genomic imprinting in PGCs is already acquired just after their derivation among pluripotent epiblast cells.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Pan, J., Goodheart, M., Chuma, S., Nakatsuji, N., Page, D.C., Wang, P.J. : RNF17, a component of the mammalian germ cell nuage, is essential for spermiogenesis : *Development* **132** : 4029-4039 (2005)
- Shoji, M., Chuma, S., Yoshida, K., Morita, T., Nakatsuji, N. : RNA interference during spermatogenesis in mice. *Dev. Biol.* **282** : 524-534 (2005)
- Isotani, A., Nakanishi, T., Kobayashi, S., Lee, J., Chuma, S., Nakatsuji, N., Ishino, F., Okabe, M. : Genomic imprinting of XX spermatogonia and XX oocytes recovered from XX<-->XY chimeric testes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102** : 4039-4044 (2005)
- Chuma, S., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., Hosokawa, M., Nakatsuji, N., Ogura, A., Shinohara, T. : Spermatogenesis from epiblast and primordial germ cells following transplantation into postnatal mouse testis. *Development* **132** : 117-122 (2005)
- Hatano, S., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Tada, T. : Pluripotent competence of cells associated with Nanog activity. *Mech. Dev.* **122** : 67-79 (2005)
- Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M., Hayashi, H., Imazato, T., Kawasaki, H., Suemori, H., Omachi, S., Iida, H., Itoh, N., Nakatsuji, N., Sasai, Y. and Hashimoto, N. : Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* **115** : 102-109 (2005)

- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, K., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Tada, T. : Octamer and Sox elements are required for transcriptional *cis*-regulation of *Nanog* gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **25** : 2475-2485 (2005).
- Yamamguchi, S., Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N. and Tada, T. : *Nanog* expression in mouse germ cell development. *Mech. Dev. Gene Expression Patterns* **5** : 639-646 (2005)
- Ishii, T., Yasuchika, K., Fujii, H., Hoppe, T., Baba, S., Naito, M., Machimoto, T., Kamo, N., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Ikai, I. : In vitro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Exp. Cell Res.* **309** : 68-77 (2005)
- Ikeda, R., MD ; Kurokawa, M. S., Chiba, S., Yoshikawa, H., Ide, M., Tadokoro, M., Nito, S., Nakatsuji, N., Kondoh, Y., Nagata, K., Hashimoto, T., Suzuki, N. : Transplantation of neural cells derived from retinoic acid-treated cynomolgus monkey embryonic stem cells successfully improved motor function of hemiplegic mice with experimental brain injury. *Neurobiology of Disease* **20** : 38-48 (2005)
- Sasaki, E., Hanazawa, K., Kurita, R., Akatsuka, A., Yoshizaki, T., Ishii, H., Tanioka, Y., Ohnishi, Y., Suemizu, H., Sugawara, A., Tamaoki, N., Izawa, K., Nakazaki, Y., Hamada, H., Suemori, H., Asano, S., Nakatsuji, N., Okano, H. and Tani, K. : Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cells* **23** : 1304-1313 (2005)
- Hasegawa, K., Chuma, S., Tada, T., Sakurai, T., Tamura, M., Suemori, H., Nakatsuji, N. : Testatin transgenic and knockout mice exhibit normal sex-differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (in press)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

2) 講演・シンポジウム

- 中辻憲夫：特別講演「ヒト ES 細胞株の樹立と利用：なぜ万能細胞と呼ばれるのか」．第 26 回日本病院薬剤師会近畿学術大会 (2005.1.30. 京都)
- 中辻憲夫：特別講演「ヒト ES 細胞株の樹立と再生医療」．第 4 回日本再生医療学会総会 (2005.3.1. 大阪)
- 中辻憲夫：ヒト ES 細胞はなぜ万能か．京都大学附置研究所シンポジウム (2005.3.10. 宇治)
- 中辻憲夫：ES 細胞－基礎研究から再生医学までの多様な役割を果たす万能細胞.日本畜産学会第 104 回大会 (2005.3.28. 東京)
- Norio Nakatsuji : Establishment, manipulation and distribution of human ES cell lines in Japan for biomedical and pharmaceutical research. HGM2005 Human Genome Meeting (2005.4.19. Kyoto)
- 中辻憲夫：ヒト ES 細胞株の樹立と医学研究．第 104 回日本皮膚科学学会総会 (2005.4.23. 横浜)
- 中辻憲夫：特別講演「ヒト ES 細胞株の樹立と医学応用－なぜ万能細胞と呼ばれるのか」．第 42 回日本臨床分子医学学会学術集会 (2005.7.22. 京都)
- 中辻憲夫：ヒト ES 細胞株とバイオメディカル R&D. BioJapan 2005 (2005.9.7. 横浜)
- 中辻憲夫：ヒト ES 細胞株の樹立と利用：なぜ万能細胞と呼ばれるのか．ナショナルバイオリソースプロジェクト「細胞」シンポジウム (2005.9.29. 東京)
- 中辻憲夫：招待講演「ヒト ES 細胞株の樹立と医学応用－なぜ万能細胞と呼ばれるのか」．第 14 回日本形成外科学

会基礎学術集会(2005.10.14. 東京)

Chuma, S., Hosokawa, M., Shoji, M., Kitamura, K., Tanaka, T., Nakatsuji, N. : Tudor-related proteins and the germ cell nuage in mice. International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (2005.11.15-18. Kyoto)

Hosokawa, M., Shoji, M., Kitamura, K., Noce, T., Chuma, S., Nakatsuji, N. : Intracellular localization of Tudor-related proteins TDRD1/MTR-1, TDRD6 and TDRD7/TRAP during spermatogenesis in mice. International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (2005.11.15-18. Kyoto)

Shoji, M., Chuma, S., Yoshida, K., Morita, T., Nakatsuji, N. : Gene transfer to spermatogenic cells in vivo and its application. International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (2005. 11.15-18. Kyoto)



再生誘導研究分野 Department of Stem Cell Biology

分野主任 教授 山中 伸弥

Prof. Shinya Yamanaka

【研究概要】

哺乳動物初期胚(胚盤胞の内部細胞塊)から樹立された幹細胞である ES 細胞はすべての細胞に分化できる多能性を維持したまま無限に増殖する。これらの特性から、ヒト ES 細胞は再生医学への応用が期待されている。しかしヒト胚を利用することに対して倫理的見地からの強い反対論があり、患者に移植した際の拒絶反応や腫瘍形成も大きな問題となる。私たちは患者自身の細胞から ES 細胞に類似した多能性と増殖能を有し、腫瘍形成能は持たない幹細胞を樹立することを目標に研究を行っている。そのために、ES 細胞が分化多能性、高い増殖能および腫瘍形成能を維持する分子機構を解析している。また分化細胞核を初期化する因子の探索を行っている。平成 17 年度の成果は以下の通りである。

1. ECAT15(Sox15)による転写調節

Sox(SRY 関連 HMG ボックス)ファミリー転写因子群は性決定遺伝子である Sry で最初に同定された HMG(High mobility group)ドメインを有するタンパク質であり、細胞分化や形態形成に関与していることが知られている。マウス胚性幹(ES)細胞においてこれまで Sox2 が唯一発現している Sox 遺伝子であると考えられていたが、Sox15 遺伝子も ES 細胞において特異的に発現することを見出した。そこで Sox15 の機能解析および Sox2 との機能比較を行った。

In vitro の実験から、Sox15 は Sox2 と同じ DNA 配列を認識するが結合能が低いことがわかった(図 1)。また、Sox15 は Sox2 のパートナー因子である Oct3/4 と協調して Sox2 の標的遺伝子である Fgf4 や Fbx15 などの遺伝子転写を活性化することも明らかにした。

しかし、*In vivo* の実験では Sox2 欠損胚が着床前後に致死となるのに対して、Sox15 欠損胚は正常に発生し妊娠も有していた。また Sox2 欠損 ES 細胞は樹立できないが、Sox15 欠損 ES 細胞は形態、増殖、分化能ともに正常であった。

さらに DNA マイクロアレーの結果、Sox15 欠損細胞においては Nanog, Fgf4, Utf1 などの Sox2 標的遺伝子は正常に発現していた。しかし、Hrc や Otx2 などの発現は有意に変化が認められた。Sox15 は Hrc 遺伝子に結合するが、Nanog などの Sox2 標的遺伝子には結合しないことがわかった。また、Sox2 は *in vitro* では Hrc 遺伝子に強く結合するが、*in vivo* では結合していなかった。これらの結果から、Sox15 は ES 細胞内においては Sox2 とは異なる標的遺伝子群の発現調節を行っていると思われる。

2. ECAT5(ERas)の細胞膜局在機構

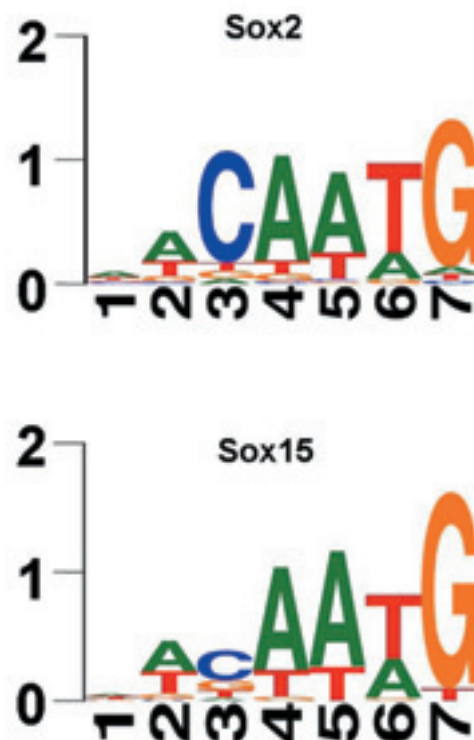
ERas は私たちが 2003 年に報告した、ES 細胞で特異的に発現する Ras ファミリータンパク質である。ERas はやはり Raf ファミリーに属する Ras homolog enriched in brain (Rheb) といくつかの共通点を有している。ERas と Rheb は共に高い GTP 親和性を持ち、PI3 kinase 経路において機能している。また、Ras タンパク質が細胞膜に局在するために必要である CAAX モチーフがコンセンサス配列と異なる点でも類似している。本研究では ERas と Rheb の細胞内局在とその機構を明らかにすることを目的とした。

共焦点顕微鏡を用いた観察から、ERas は細胞膜に、Rheb は細胞内膜に局在していることがわかった。また、これらの局在は CAAX モチーフにおけるシステイン残基への変異導入やファルネシル基転移酵素阻害剤処理によって阻害された。Ras タンパク質の翻訳後修飾に関与する Ras-converting enzyme 1 (Rce1) または Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (Icmt) 欠損細胞において、ERas は主にゴルジ体に局在し、Rheb は細胞質へ拡散した。

さらに、ERas は CAAX モチーフの上流に 2 つのシステイン残基を有しており、これらがパルミチン酸を付加されることが細胞膜局在に必須であることを変異体や阻害剤を用いた実験により明らかにした。Rheb の C 末端領域を HRas の C 末端領域配列に置換したキメラタンパク質は細胞膜に局在したことから、Rheb が細胞膜に局在しない原因は CAAX モチーフの上流にシステイン残基が存在したためであると考えられた。

以上の結果より、ERas は典型的な CAAX モチーフを持つ HRas, NRas などと同様の翻訳後修飾を受けて細胞膜に局在することがわかった。さらに、Rheb も同様の修飾を受けるが CAAX モチーフの上流にシステイン残基や塩基性残基を持たないために細胞膜に局在しないと結論付けた。

Embryonic stem (ES) cells derived from inner cell mass of mammalian blastocysts proliferate infinitely while maintaining pluripotency. These properties make ES cells attractive sources for cell therapy to various diseases, such as diabetics and Parkinson Disease. However, many people are against using human ES



Sox2 および Sox15 の結合 DNA 配列。Selex 法により決定した認識 DNA 配列を Logo 法にて表示したもの。DNA recognition sequences of Sox2 and Sox15. We determined these binding sequences by Selex *in vitro*. Data are presented with the Logo method.

cells since human embryos have to be destroyed. In addition, undifferentiated ES cells cause tumors when transplanted, which might preclude their therapeutic usage. The ultimate goal of our research is to establish pluripotent and immortal, but not tumorigenic, stem cells directly from patient's somatic cells. To this end, we have been trying to understand molecular mechanisms underlying pluripotency, rapid proliferation and tumorigenicity of ES cells. We have been also trying to identify factors that can induce nuclear reprogramming.

1. Different roles of Sox15 and Sox2 in ES cells and early mouse embryos

Sox family transcription factors play essential roles in cell differentiation, development and sex determination. Sox 2 was previously thought to be the sole Sox protein expressed in mouse embryonic stem (ES) cells. Sox2 associates with Oct3/4 to maintain self-renewal of ES cells. In the current study, digital differential display identified transcripts for an additional Sox family member, Sox15, enriched in mouse ES cells. RT-PCR confirmed that Sox15 expression is highest in undifferentiated ES cells and repressed upon differentiation. Sox15 is expressed at low levels in several tissues including testis and muscle. In vitro studies showed that Sox15, like Sox2, associated with Oct3/4 on DNA sequences containing the octamer motif and Sox-binding site. Gel mobility shift assays and SELEX analyses showed that Sox15 binds similar DNA sequences as Sox2, but with weaker affinity (Fig.1). In contrast to the early embryonic lethality observed in Sox2-null mice, Sox15-null ES cells and mice were grossly normal. DNA microarray analyses revealed that Otx2, Ctgf, Ebf, and Hrc are dysregulated in Sox15-null ES cells, however. Chromatin-immunoprecipitation showed that Sox15, but not Sox2, bound to a Sox consensus binding site within the Hrc gene. Taken together, these data demonstrate differential roles for Sox15 and Sox2 in transcriptional control in mouse ES cells.

2. Differential membrane localization of ERas and Rheb

Two Ras-related proteins, ERas and Rheb, which are involved in the phosphatidylinositol-3 kinase pathway, display high GTP affinity and have atypical CAAX motifs. The factors governing the intracellular localization of ERas and Rheb are incompletely understood. In the current study, we show by confocal microscopy that ERas is localized to the plasma membrane, whereas Rheb is confined to the endomembranes. Membrane localization of the two proteins was abolished by mutation of the cysteine of the CAAX motif. Membrane targeting was also abolished by a farnesyltransferase inhibitor, but not by a geranylgeranyltransferase inhibitor. In mouse fibroblasts deficient in either Rce1 (Ras converting enzyme 1) or Icmt (isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase), ERas was mislocalized mainly to the Golgi apparatus, whereas Rheb showed diffuse localization. Mutation of cysteines in the hypervariable region of ERas prevented the plasma membrane localization of ERas, very strongly suggesting that palmitoylation of the cysteines is essential for membrane targeting. The hypervariable region of Rheb does not contain cysteines or polybasic residues, and when it was replaced with the hypervariable region of H-Ras, Rheb displayed plasma membrane localization. These data indicate that ERas shares the same posttranslational modifications with H-Ras and N-Ras and is localized at the plasma membrane. Rheb also shares the same membrane-targeting pathway, but due to the absence of palmitoylation is located on endomembranes.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Takahashi K., Nakagawa M., Young S.G. and Yamanaka S. Differential membrane localization of ERas and Rheb, Two Ras-related proteins involved in the PI3 kinase / mTOR pathway. *J. Biol. Chem.*, **280** : 32768-74, 2005
- Maruyama M., Ichisaka T., Nakagawa M. and Yamanaka S. Differential roles for SOX15 and SOX2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **280** : 24371-9, 2005
- Wang X, Beugnet A., Murakami M., Yamanaka S. and Proud C.G. Distinct signaling events downstream of mTOR co-operate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **25** : 2558-72, 2005
- Takahashi K., Maruyama M., Tokuzawa Y, Murakami M, Oda Y, Yoshikane N, Makabe KW, Ichisaka T, Yamanaka S. Evolutionarily Conserved Non-AUG Translation Initiation in *NAT1/p97/DAP5 (EIF4G2)*, *Genomics* **85** : 360-71, 2005
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Tanaka M, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y & Shimomura I. Visfatin : A Protein Secreted by Visceral Fat that Mimics the Effects of Insulin. *Science* **307** : 426-430, 2005

2) 総説

- Takahashi K., Murakami M. and Yamanaka S. Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans.* **33** : 1522-5, 2005
- 山中伸弥：ES細胞の長期自己複製能と腫瘍形成能 最新医学 **60** : 1677-82, 2005
- 山中伸弥：奇形腫形成によるES細胞の評価法 BIO バイオテクノロジージャーナル **5** : 543-6, 2005
- 山中伸弥：ES細胞による心血管系治療への展望と課題 血管 **28** : 33-8, 2005
- 中川誠人, 山中伸弥：胚性幹細胞と内部細胞塊における分化多能性維持機構 蛋白質核酸酵素(増刊 発生システムのダイナミックス)**50** : 546-50, 2005
- 山中伸弥：Nanog/ERas(私の名付けた遺伝子5)実験医学 **23** : 1236-8, 2005
- 山中伸弥：ES細胞臨床応用への障壁とその克服に向けた基礎研究 BIO INDUSTRY **22** : 24-28.2005
- Takahashi K., Ichisaka T. and Yamanaka S. Identification of genes involved in tumor-like properties of ES cells. *Embryonic Stem Cells-II : Methods and Protocols*, in press
- Tokuzawa Y., Maruyama M. and Yamanaka S. Utilization of digital differential display to identify novel targets of Oct 3/4. *Embryonic Stem Cells-II : Methods and Protocols*, in press
- 高橋和利, 村上未玲, 一阪朋子, 山中伸弥 ERasによるES細胞の腫瘍形成制御機構 細胞工学 **24** : 17-19.2005
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 中川誠人：マウス ES 細胞における分化多能性の維持機構「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 2 回公開シンポジウム(2005.12.16. 東京)
- 沖田圭介：GFP ノックインを用いた Nanog 発現細胞の探索と解析「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 2 回公開シンポジウム(2005.12.16. 東京)
- 丸山昌良：転写因子とエピジェネティック修飾による Nanog 遺伝子の発現調節機構「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第 2 回公開シンポジウム(2005.12.16. 東京)
- 中川誠人，坪岡則子，中村友紀，山中伸弥：Mechanism for maintaining pluripotency in mouse embryonic stem cells. 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.9. 福岡)
- 沖田圭介，一阪朋子，中川誠人，山中伸弥：E G F P レポーターマウスを用いた生体における Nanog 陽性細胞の機能解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.9. 福岡)
- 丸山昌弘，今村公紀，伊藤宏晃，三浦恭子，一阪朋子，中川誠人，山中伸弥：転写因子とエピジェネティック修飾による Nanog 遺伝子の発現調節機構 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.9. 福岡)
- 村上未玲，一阪朋子，西澤雅子，岸本加恵，平松隆司，山中伸弥：初期胚発生と ES 細胞における Visfatin の機能解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.9. 福岡)
- 今村公紀，篠原隆司，中川誠人，山中伸弥：未分化 ES 細胞特異的に発現する遺伝子群 ECAT における DNA メチル化状態のプロファイリング 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.9. 福岡)
- 坪岡則子，一阪朋子，中川誠人，山中伸弥：未分化 ES 細胞で高発現する Zn フィンガータンパク質 Sall4 の機能解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.9. 福岡)
- 三浦恭子，中川誠人，山中伸弥：未分化 ES 細胞と精巣特異的に発現する Rnf17 の発現及び遺伝子構造解析 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.9. 福岡)
- 中川誠人，山中伸弥：Regulation of gene expression by transcription factors and epigenetic modification in mouse ES cells. 15th Lake Shirakaba Conference (2005.11.29. デンマーク)
- 村上未玲，高橋和利，一阪朋子，岸本加恵，西澤雅子，平松隆司，山中伸弥：ES 細胞における ERas および Visfatin の機能解析 第 3 回幹細胞シンポジウム(2005.4.22. 兵庫)
- 丸山昌良，今村公紀，一阪朋子，山中伸弥：マウス ES 細胞で高発現する転写因子の相互作用 第 3 回幹細胞シンポジウム(2005.4.22. 兵庫)
- 高橋和利，一阪朋子，山中伸弥：PI-kinase による ES 細胞の増殖促進と多能性維持 第 3 回幹細胞シンポジウム(2005.4.21. 兵庫)
- 小田泰昭，一阪朋子，山中伸弥：ES 細胞で発現する GDF3 の機能解析 第 3 回幹細胞シンポジウム(2005.4.21. 兵庫)
- 今村公紀，山中伸弥：ES 細胞特異的遺伝子のエピジェネティックな発現調節機構 第 3 回幹細胞シンポジウム(2005.4.21. 兵庫)

2) 講演・シンポジウム

- 山中 伸弥：ES 細胞における分化多能性と増殖 京都大学再生医科学研究所平成 17 年度学術講演会(2005.12.22. 京

都)

山中伸弥: Pluripotency and the Homeobox Protein Nanog. International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (2005.12.18. 京都)

山中伸弥: 細胞脱分化の誘導-拒絶反応と倫理的問題の多い多能性幹細胞樹立を目指して「免疫難病・感染症等の先進医療技術」第2回公開シンポジウム (2005.12.16. 東京)

山中伸弥: Roles of the P13 kinase pathway in mouse embryonic stem cells. 第28回日本分子生物学会年会 (2005.12.9. 福岡)

山中伸弥: ES細胞における多能性維持機構 第28回日本分子生物学会年会「バイオテクノロジーセミナー」 (2005.12.9. 福岡)

山中伸弥: 分化多能性の必須因子 Nanog の発現調節機構 第2回マクロチン・フロンティアーズ・ジャパン (2005.11.22. 京都)

山中伸弥: Roles of the P13 kinase pathway in mouse embryonic stem cells. 「細胞周期制御」国際シンポジウム—Cell Cycle and Development— (2005.11.21. 名古屋)

山中伸弥: ES細胞研究の現状と課題 第44回日本臨床細胞学会秋期大会ランチョンセミナー3 (2005.11.12. 奈良)

山中伸弥: Inner cell mass and embryonic stem cells : Similarities and differences. 2nd International Symposium and annual meeting of Dynamics of Developmental Systems (2005.11.5. 千葉)

山中伸弥: ES細胞の現状と展望 第7回京都サイトカイン研究会 (2005.9.2. 京都)

山中伸弥: Roles of Sox2 and Sox15 in mouse ES cells. The 1st SOX meeting (2005. 8.30. オーストラリア)

山中伸弥: 分化多能性の分子基盤 第9回 Molecular Cardiovascular Conference (2005.8.28. 北海道)

山中伸弥: ECAT: ES Cell Associated Transcripts. The 60th Annual Meeting of the Korean Association of Biological Sciences (2005.8.18. 韓国)

山中伸弥: Factors maintaining pluripotency and rapid proliferation of murine ES cells. Seminars at Hanyang University (2005.8.16. Korea)

山中伸弥: Roles of PI3 kinase pathway in mouse ES cells. BioScience 2005 (2005.7.19. UK)

山中伸弥: ES細胞の現状と課題 The 3rd Metabolic Syndrome Conference (2005.7.16. 京都)

山中伸弥: ES細胞研究の現状と臨床応用への展開 第5回心血管再生先端治療フォーラム (2005.7.9. 東京)

山中伸弥: Regulatory Proteins Required for Maintenance of Pluripotency in Embryonic Stem Cells. The 3rd World Congress of Nephrology (2005.6.27. シンガポール)

山中伸弥: Factors maintaining pluripotency and rapid proliferation of murine ES cells. Seminar at Johns Hopkins University, School of Medicine, Institute for Cell Engineering (2005.6.21. USA)

山中伸弥: 再生医療とクローン技術～整形外科領域への展望～ 市整会学術講演会 (2005.6.18. 大阪)

山中伸弥: Regulation of gene expression by transcription factors and epigenetic modification in mouse ES cells. 第58回日本細胞生物学会 (2005.6.15. 埼玉)

山中伸弥: ES細胞の分化多能性と高い増殖の分子メカニズム 第7回消化器病病態研究会 (2005.5.13. 名古屋)

山中伸弥: Factors Promoting Rapid Proliferation of Embryonic Stem Cells Seminar at Genomics Research Center, Academia Sinica (2005.4.18. 台湾)

山中伸弥: Factors Maintaining Pluripotency of ES Cells. The 1st meeting of the Taiwan Stem Cell Society (2005.4.16.

台湾)

山中伸弥：ES 細胞と再生医学—現状と展望 第 19 回皮膚疾患の病態と治療シンポジウム(2005.4.2. 東京)

山中伸弥：分化多能性と生殖細胞分化 第 1 回特定領域研究「性分化機構の解明」領域会議(2005.3.23. 熊本)

山中伸弥：Factors Maintaining Pluripotency. Keystone Symposium (2005.2.14. カナダ)

山中伸弥：ES 細胞の現状と展望 第 33 回九大第一内科最新医学セミナー(2005.1.18. 京都)

再生増殖制御学分野 Department of Growth Regulation

分野主任 教授 瀬原(藤沢)淳子

Prof. Atsuko Sehara(Fujisawa)

【研究概要】

多細胞生物の個体としての調和した成長は、それら細胞間の接着やシグナルのやりとりなどの相互作用に依存している。私達の研究グループは、発生や形態形成にかかわるそれら細胞間相互作用の分子実体を解明することをひとつの大きな目標としている。その解明はさまざまな疾病の理解と治療の基盤をなすものである。現在は ADAM プロテアーゼによる細胞増殖や分化の制御機構の解明を中心とする研究をおこなっている。特に、世界に先駆けてこのファミリーに属する遺伝子群メルトリン α /ADAM12, β /ADAM19, γ /ADAM9 をクローニングし、その機能や形態形成におけるこれらの遺伝子の役割を検討してきた。まず、遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作成することによって、メルトリン α は褐色脂肪組織とそのまわりの骨格筋形成に関わることを、そして肥満にも関わることを示した。メルトリン β は心臓の弁や心室中隔を形成する心内膜細胞の増殖や分化にかかわることを示した。そして、これらメルトリン α , β が膜型増殖因子ニューレグリン(別名グリア増殖因子)や HB-EGF などの ErbB リガンドの細胞外ドメインの切断に関わることを、同時にこれら膜型 ErbB リガンドを切断するプロテアーゼには複数あることもわかり、ectodomain shedding に潜む複雑な制御機構が浮かび上がってきた。これらに関しては、昨年までの年報でその概要を紹介してきた。

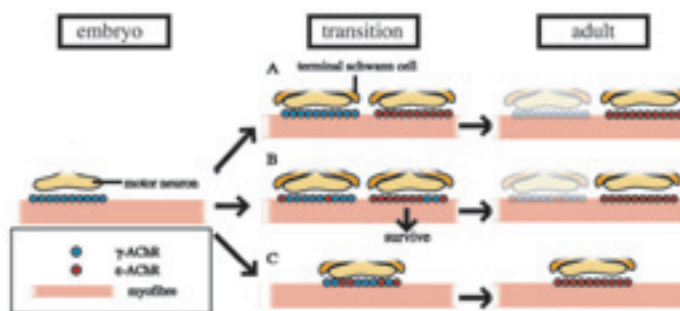
今年度の年報では、少し視点を変えた研究として、骨格筋と神経細胞とのシナプス形成に関する研究を取り上げたい。

発生・再生過程における細胞増殖や分化の制御機構を知るためには、骨格筋は、全て運動神経の支配の下に収縮する。そして除神経により筋組織は破壊する。このような神経と筋の相互作用の形成・維持の分子メカニズムは未解明な部分が多い。神経と筋の相互作用には、神経が伝達物質アセチルコリンを放出しこれを筋側のアセチルコリン受容体(AChR)が受容する場合、神経筋接合部(neuro-muscular junction: NMJ)の形成が不可欠である。従って、NMJ の形成機構やその構造を知る事によって、どのように神経と筋の相互作用が形成され、維持されるのかを解明できると考えられる。また、神経同士のシナプスに比べて NMJ はきわめて大きなシナプスであることから、シナプス形成やその可塑性に共通する分子機構の解明へとつながるものである。

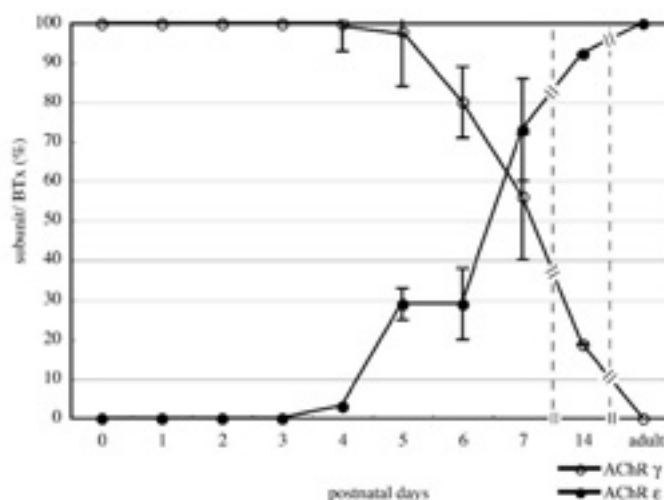
骨格筋の AChR は、五量体のイオンチャネルであり、 $\alpha 2 \beta \gamma \delta$ の胎児型と $\alpha 2 \beta \delta \epsilon$ の成体型の二種類が存在する。

発生過程においてこの γ サブユニットが ϵ サブユニットに置換される事の重要性は、ヒトにおいては ϵ サブユニットの変異が重症筋無力症の原因の一つである事や、 ϵ サブユニットの遺伝子欠損マウスが生後数ヶ月で致死である事からも分かるが、この置換現象のメカニズムについては不明なところが多い。そもそも、成体型は、筋繊維(多核の筋細胞)の上で胎児型と同じ場所に集まりそれらに置き換わるのだろうか、それとも空間的に異なる場所に新たなシナプスが形成され、そこに成体型のAChRが集積するのだろうか？(図1)

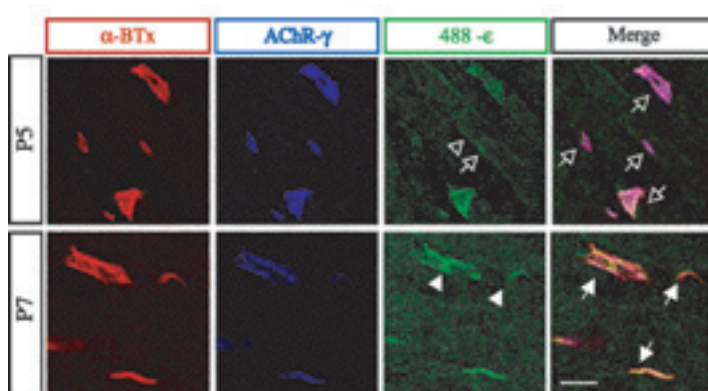
そこで、医学研究科博士課程の湯本法弘は、このNMJ形成機構の解明の一端として、 γ 、 ϵ サブユニットの変換が個体の発達の中に、どのように達成されるのかについて研究を行い、重要な成果を挙げた。まず、 γ サブユニット、 ϵ サブユニットに対する特異抗体を作成し、その変換が生後のどの時期に起こるのかと言う事を詳細に調べた。マウス新生仔の横隔膜を用いて、AChR α サブユニットに特異的に結合する α ブングロトキシンで全神経終板(シナプス後膜にあたる)を標識すると同時に、 γ 、 ϵ サブユニットのそれぞれの特異抗体で二重染色し、全神経終板中の γ 陽性、 ϵ 陽性の神経終板の割合を算出した。図2のように、生後4日まではほぼ全ての神経終板が γ 陽性、 ϵ 陰性であるのに対し、生後5日目には ϵ 陽性の神経終板の割合が増え始め、生後7日目には γ 、 ϵ 陽性のそれぞれの神経終板の割合が逆転した(図2)。従来まではサブユニットの置換は生後1-2週間の間に起こると認識されていたが、今回の実験で標本を経時的に詳細に得る事によって、変換は生後の比較的初期に、しかも短期間のうちに発現量の逆転が起こるという事を示す事ができた。次に、生後5-7日に生じるサブユニットの変換は個々の神経終板内で起こる現象なのか否かということ調べた。これは、 ϵ サブユニット抗体を直接蛍光標識し、 γ サブユニット抗体と α ブングロトキシンとの三重染色を成功させた事で、初めて見る事が出来た(図3)。生後5日(P5)の横隔膜においては、図2のように γ サブユニットに比べ、 ϵ サブユニットの染色強度は弱い。一方、P7の横隔膜においては、 ϵ サブユニットの発現が強く、 γ サブユニットの発現が弱くなっている。ここで最も注目すべき事は、これら γ 、 ϵ サブ



(図1) シナプスの胎児型(γ)から成体型(ϵ)への変遷モデル。我々の研究結果は、モデルCを支持した。



(図2) マウス横隔膜における、アセチルコリンレセプターの胎児型(γ)から成体型(ϵ)への変遷は、生後5~7日目に起こる。



(図3) アセチルコリンレセプターの胎児型(γ)から成体型(ϵ)への変遷は、同じポストシナプス(矢印)でおこる。

ニットの発現は P5, P7 のいずれにおいても、同一の神経終板内で生じている事である (P5; open arrow, P7; closed arrow)。したがって、これまで漠然と捉えられていたサブユニットの変換現象は、これらのサブユニットが異なる神経終板を形成するのではなく、生後短期間に同一のシナプスで起こる、まさに「置換」と言うべき現象である事を明らかにした。

興味深い事に、P5-P7 の時期は、新生マウスの中で一本の筋線維が複数の軸索により支配を受けていた時期から、単数の軸索に支配が変わる時、軸索の退縮(axon elimination)が活発に起きている時期とほぼ一致する (Balice-Gordon RJ et al. J Neurosci. 1993)。このことから、AChR のサブユニットの置換は神経との相互作用の何らかの変化に依存する、あるいは逆に、サブユニット置換が軸索の退縮に影響を与えうる重要な現象ではないかと考える事が出来る。

(English)

Coordinated development of multi-cellular organisms depends on intercellular communications and adhesions. Our research has been focused on regulatory mechanisms of such cell-cell interactions during development, mainly those of myogenesis. Numerous intercellular signaling molecules are generated as membrane-anchored proteins, and they are subjected to proteolytic processing to liberate their extracellular domains (ectodomain shedding). Molecular bases that regulate the ectodomain shedding processes are coming into focus. Evidence suggests that ADAM family proteases are involved in the ectodomain shedding of various membrane proteins. We are currently studying roles of ADAM proteases in development or diseases, which will clarify physiological significance of ectodomain shedding mediated by ADAM proteases. These works were outlined in previous leaflets.

In this leaflet, I would like to introduce you our recent work on formation of neuromuscular junction, establishment of synapses between motor neurons and skeletal muscle cells. Myogenesis involves multiple steps including production of myoblasts, their fusion to each other to form myotubes, and maturation to functional muscles that contain well-organized structural proteins and twitch accurately and efficiently under the control of motor nerves. Thus, studies on development of neuromuscular junction (NMJ) not only provide plenty of knowledge on the synapse formation and its plasticity, as one of the simplest models for synaptogenesis, but also elucidate molecular mechanisms of muscle maturation. A couple of key processes are required for formation of NMJ. One is the clustering or accumulation of nicotinic acetylcholine receptor (AChR) channels at endplates, the sites of neuromuscular contact. Another process is molecular switch in the composition of AChR subunits from embryonic ($\alpha 2\beta\gamma\delta$) to adult ($\alpha 2\beta\epsilon\delta$) types. The maturation of muscle also accompanies establishment of a single axon innervation. That is, a single muscle fiber achieves transition of innervation status from multiple axons to a single axon. These processes are considered as morphological and biochemical hallmarks of muscle maturation during development. As a step to understand molecular mechanisms of the g-to-e switch, we addressed a question whether embryonic and adult type AChRs constitute different endplates during transitional period. Based on the analyses with double or triple staining with anti- γ - and/or anti- ϵ -antibodies together with α -bungarotoxin that binds to α -subunits, we demonstrated that adult type AChRs are incorporated into individual endplates expressing embryonic AChRs, and replace them gradually during neonatal stages in mice. The main period of AChR transition in diaphragm of mice was between postnatal day 5 (P5) and P7, more or less the same as the period described previously in which endplates shift from multi-axon to single axon innervation. This finding will help understanding mechanisms of the γ -to- ϵ switch during establishment of neuromuscular junction.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Yumoto, N., Wakatsuki, S., Sehara-Fujisawa, A. : The acetylcholine receptor γ -to- ε switch occurs in individual end-plates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331 : 1522-1527 (2005)

Masaki, M., Kurisaki, T., Shirakawa, K., Sehara-Fujisawa, A. : Role of Meltrin α (ADAM12) in obesity induced by high-fat diet. *Endocrinology*, 146(4) : 1752-63 (2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Megumi Masaki, Tomohiro Kurisaki, Atsuko Sehara-Fujisawa : Role of Meltrin alpha (ADAM12) in obesity induces by high-fat diet. 第 58 回日本細胞生物学会大会 (2005.6.16. さいたま市)

Masaki, M., Kurisaki, T., Sehara, A. : Role of Meltrin alpha (ADAM12) in adipogenesis. 15th International Society of Developmental Biologists Congress (2005. 9. 5. Sydney (Australia))

Shuji Wakatsuki, Megumi Masaki, Koji Komatsu, Norihiro Yumoto, Tomohiro Kurisaki and Atsuko Sehara-Fujisawa : Roles of Meltrins, Members of ADAM Proteases, in Development and Diseases. 4th General Meeting of the International Proteolysis Society (2005.10.15-19, Quebec-City, Canada)

2) 講演・シンポジウム

瀬原淳子：形態形成における ADAM プロテアーゼの役割，臨床研 30 周年記念シンポジウム：新しい生命科学の潮流－臨床研 OB を招いて－(2005. 1. 21. 東京都)

Shuji Wakatsuki, Kazuto Kurohara, Norihiro Yumoto, Kouji Komatsu and Atsuko Sehara-Fujisawa : Roles of Meltrin beta (ADAM19) in the ectodomain shedding of neuregulin beta 1, a membrane anchored glial growth factor. 2005 Keystone Symposia (2005. 4. 1. Breckenridge (USA))

Megumi Masaki, Tomohiro Kurisaki, Atsuko Sehara-Fujisawa : Role of Meltrin alpha (ADAM12) in obesity induces by high-fat diet. CDB Symposium 2005 (2005. 4. 11. 神戸市)

瀬原淳子：形態形成・病気における ADAM プロテアーゼメルトリンの役割と機能，第 154 回 CARD セミナー (2005. 8. 22. 熊本市)

若月修二，湯本法弘，小松紘司，宮川剛，瀬原淳子：神経組織形成における膜型プロテアーゼメルトリン β /ADAM 19 の役割，研究領域「生物の発生・分化・再生」第 4 回公開シンポジウム (2005. 10. 4. 東京都)

瀬原淳子：膜型増殖因子の切断制御における ADAM プロテアーゼの役割，群馬大学生体調整研究所シンポジウム「細胞内膜輸送のダイナミクス」(2005. 11. 15. 前橋市)



再生免疫学分野 Department of Immunology

助教授 喜納 辰夫

Assoc. Prof. Tatsuo Kina

【研究概要】

再生免疫学分野では現在、2つの研究プロジェクトを主要なテーマとして研究を行っている。第一のテーマは、ヒトのアトピー性皮膚炎やアレルギー性結膜炎・中耳炎に類似したアレルギー症状を発症するモデルマウスとして、当研究分野で樹立した BALB/c バックグラウンドの CD45.1 コンジェニックマウス (BALB/c.CD45.1) についての研究である。このマウスでは、生後半年以降、ヒトのアレルギー疾患に似たアレルギー症状を自然発症するが、この原因が造血系細胞に特異的に発現される細胞表面抗原である CD45 のアロタイプ変異が原因と考えられることから、これまで報告されてきたアレルギー発症マウスとは異なり、単一の遺伝子の変異によるアレルギー発症モデルであり、モデルマウスとしてユニークな系と考えている。このマウスをモデルとしてアレルギー発症の原因を細胞レベルおよび分子レベルで解明するとともに、アレルギーの治療モデルを確立することを目指したい。第2のテーマは、X線照射によって誘発されるマウス胸腺リンパ腫の発症機構と、それにとまって引き起こされる TCR β 鎖の遺伝子組換え機構の解析である。動物に致死量以下の放射線を照射するとリンパ腫や白血病が多発することが知られているが、特に T 細胞系リンパ腫については放射線照射にともなう T 細胞抗原受容体ベータ鎖 (TCR β) の組換え異常による遺伝子変異がその引き金となっていることが考えられている。X線照射によるマウス胸腺リンパ腫の発症をモデルとして、リンパ腫発症と TCR β 鎖の組換え異常の関係について解析を進めたい。

(1) BALB/c.CD45.1 コンジェニックマウスにおける免疫異常の発症機構

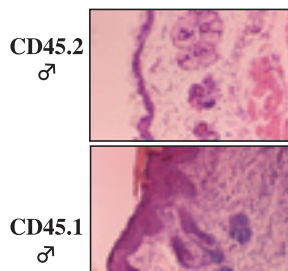
哺乳類の造血系細胞に特異的に発現される細胞表面分子である CD45 は、その生化学的機能として、シグナル伝達分子のチロシン残基を特異的に脱リン酸化するチロシン脱リン酸化酵素の主要な分子として知られる。リンパ球における CD45 の役割として、Src 型チロシンキナーゼを脱リン酸化することによってその活性を正・負の方向に調節することが知られている。CD45 は、この正・負の調節機能によって、感染や炎症におけるリンパ球や白血球などの生体防御反応を様々な形で調節しているものと考えられる。最近ヒトにおいて、CD45 の突然変異や欠失

A. Atopic dermatitis and conjunctivitis



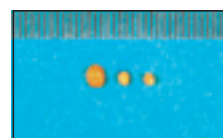
CD45.1 ♀ CD45.1 ♂

B. Dermatitis



(HE staining)

C. Lymphadenopathy



1 2 3

1. CD45.2 ♂ 3mo
2. CD45.1 ♂ 3mo
3. CD45.1 ♂ 8mo

BALB/c.CD45.1 コンジェニックマウスでは、生後半年以降、高率で頭部の皮膚炎や目・耳にアレルギー性炎症を発症する(A)。皮膚炎部位の皮膚の肥厚とケラトーシスも顕著となる(B)。また、炎症部位に近いリンパ節の増大も見られ、その増加の多くは B 細胞である(C)。

が重篤な免疫不全症を惹起する症例や、細菌感染における抵抗性の低下、多発性硬化症の発症などに関与することが報告され、生体防御機構における CD45 の新たな役割が注目されている。我々が樹立した BALB/c.CD45.1 コンジェニックマウスは、通常の BALB/c マウス (CD45.2) と比較して、その CD45 分子の細胞膜外部位にわずかに 5 個のアミノ酸の違いが存在するのみであるが、生後半年以降、高頻度で頭背部の皮膚炎、目や耳にアレルギー性の結膜炎や中耳炎などの炎症を発症することが判明した。通常の BALB/c マウスではこのような現象は認められず、CD45 のアロタイプの変異によって免疫系の調節機構に異常が生じる可能性を示している。これまでの解析から、CD45.1 マウスでは、(A) Th2 型サイトカインの産生亢進、(B) 血中 IgE の増加、(C) B 細胞の LPS 反応性の異常、(D) Ig クラススイッチに関連する AID や IgE germline message の発現亢進などの異常が認められた。これらの現象は、CD45.1 マウスが環境因子に対して過剰に反応して種々のアレルギーを発症していることが示すものと考えられる。最近の研究結果から、CD45.1 マウスのリンパ節 B 細胞において抗原刺激後の Jak3/Stat6 のリン酸化の亢進が認められることや、半年以降の年齢のマウスにおいて CD45 の脱リン酸化活性が、週齢とともに CD45.1 マウスの CD45 分子の脱リン酸化活性が低下していると結果が得られたことから、CD45.1 マウスにおけるアレルギー発症の原因が CD45.1 の脱リン酸化活性の低下によるリンパ球活性化の調節異常によって引き起こされていることが確実となった。今後は、CD45.1 分子における脱リン酸化活性の低下の原因を分子構造レベルで明らかにするとともに、RNA 干渉などの分子創薬の手法を用いて副作用の少ないアレルギー治療法の開発を試みたい。

(2) X線照射による胸腺リンパ腫発症と TCR β 鎖遺伝子組換え機構

マウスに致死量以下の放射線を照射すると、胸腺が萎縮することが知られている。このことは、胸腺細胞の大部分を占める TCR⁺ T 細胞の放射線に対する感受性が高く、死にやすいことに起因する。一方、少数ながら存在している未分化 T 細胞は感受性が低く、一部は生き残りそれらが分化・増殖することで、時間経過とともに胸腺が“再生”される。しかし、この過程でしばしば再生が正常に進まず、リンパ腫が発生する。リンパ腫誘発の原因の大部分は TCR 遺伝子 V(D)J 組換え酵素が非正統的組換えを引きおこし、癌遺伝子の異所的発現がおこるからである。このプロジェクトでは、X線照射によってマウス 60 頭に誘導された胸腺リンパ腫において、TCR β 鎖遺伝子のすべての組換えを検出し、その塩基配列を決定することで、X線が TCR β 鎖遺伝子組換え機構に及ぼす影響を解析することを試みている。その結果、これまでに以下のことが判明した。(A) 単一の T 細胞においては 1 種類の TCR β 鎖しか細胞表面に発現しない allelic exclusion という現象が胸腺リンパ腫でもみられたが、TCR β 鎖遺伝子組換えがおこった頻度が正常 T 細胞における頻度より高かった。(B) マウス 4 頭から得られたリンパ腫においては、TCR β 鎖 DJ セグメントが本来のパートナーである V セグメント以外と再配列していた。これらのリンパ腫に関しては今後、非正統的組換えの相手が既知または未知の癌遺伝子なのか、あるいはそれ以外のものなのかをクローニングして確定し、再生異常に係わった機能を解析する予定である。

Our research effort focuses on two major areas. The first is the molecular and cellular mechanisms of inflammatory diseases of BALB/c.CD45.1 congenic mice which we have recently established in our laboratory. After 6 months of age, these mice spontaneously develop various allergic symptoms such as atopic dermatitis, conjunctivitis and tympanitis. These symptoms seem to be similar to allergic reactions usually found in aged humans. As the cause of these allergic reactions appear to be due the mutations introduced in CD45.1 allotypic molecules of these congenic mice, we think that these congenic mice provide a unique model for investigating the molecular mechanism of immune disorders affected by CD45 mutations in humans. Using the latest RNA technology, we also aim to develop new effective

cures for these diseases. The second major project is the molecular mechanism of thymic lymphomagenesis in C57BL/6 mice irradiated by sub-lethal doses of X-ray. In these mice, abnormal gene rearrangements of T-cell receptor β -chain (TCR β) genes seem to affect the expression of various oncogenes in developing T cells and finally induce lymphomagenesis. By sequencing the VDJ rearrangement of TCR β genes in various lymphomas, we aim to investigate the molecular mechanism of thymic lymphomagenesis in the mouse.

(1) Molecular mechanism of immune disorders in BALB/c.CD45.1 congenic mice

The cell surface molecule CD45 is a leukocyte-specific glycoprotein which has tyrosine-specific phosphatase activity. By de-phosphorylating various src-family kinases functioning in cell signaling system, CD45 is shown to play the essential roles in both positive and negative regulation of T and B lymphocyte activation in immune responses to foreign antigens. CD45 is also shown to be participated in the regulation of macrophage/granulocyte functions in various infectious and inflammatory diseases. In humans, it has recently been shown that minor mutations or deletions in the extracellular domain of CD45 resulted in severe combined immunodeficiency or multiple sclerosis, suggesting that CD45 is involved in various aspects of human diseases. The BALB/c.CD45.1 congenic mice, which we have established by consecutive backcrossing of C57BL/6.Ly5.1 mice to BALB/c mice, carry the CD45.1 allotype of murine CD45 locus and show only five amino-acid mutations in the extracellular domain of CD45 molecules as compared to normal BALB/c mice possessing the CD45.2 allotype. We found that, these congenic mice frequently developed various inflammatory diseases such as atopic dermatitis, conjunctivitis and tympanitis after 6 months of age. Immune disorders of BALB/c.CD45.1 mice include (A) hyper IgE syndrome, (B) over-production of Th2 cytokines, (C) hyper LPS reactivity, (D) enhanced phosphorylation of Jak3/Stat6 after antigen stimulation, (E) elevated level of AID expression and germline IgE messages. We also show that tyrosine phosphatase activities of CD45 molecule expressed by lymphnode B cells of aged BALB/c.CD45.1 mice are significantly lower than that in aged BALB/c mice, thus strongly suggesting that the defective activity of CD45.1 affects regulatory functions of CD45 molecules and then cause hyper-responsiveness to environmental antigens in BALB/c.CD45.1 mice. Using this animal model of inflammatory diseases, we are aiming to establish effective cures for these diseases by introducing the latest molecular technologies.

(2) Thymic lymphomagenesis induced by X-ray irradiation and TCR β gene rearrangement

Sub-lethally irradiated mice show atrophy of their thymi which are occupied with mainly TCR⁺ T cells, indicating these T cells are highly sensitive to irradiation. On the other hand, T cells not expressing TCR are more resistant. A part of immature T cells therefore survive, differentiate and expand, and finally, the thymus is “regenerated”. However, ionizing-radiation often induces thymic lymphoma instead of normal regeneration. Lymphomagenesis is attributed to ectopic expression of an oncogene due to illegitimate rearrangement mediated by the V(D)J recombinase that ordinarily assembles TCR genes. In this study, we analyze the effects of X-ray irradiation on TCR β gene rearrangement through detecting all the rearranged constructs from 60 murine thymic lymphomas induced with the irradiation and sequencing them. So far, we have revealed that more TCR β genes underwent rearrangement and at the same time allelic exclusion was observed, and that DJ segment was connected to a DNA fragment other than V segment in four tumors. In order to examine the function of newly uncovered misjoinings in the course of aberrantly regenerating thymus, we are going to clone the illegitimately recombined fragments and determine whether they are of known or un-

known oncogene origin, or non oncogenic.

【業績目録】

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

喜納 辰夫

喜納辰夫, 折橋 郁, 藤本真慈: BALB/c.CD45.1 マウスの免疫異常と CD45.1 の脱リン酸化活性..第 35 回日本免疫学会学術集会 (2005.12.13. 横浜)

Kim, J-Y., Kina, T., Iwanaga, Y., Matsumura, K., Hyon S-H. : Attenuation of transplantation-related immune responses by the polyphenolic compound, EFCG. The 7th International Conference of Cellular Engineering. (2005.9.7. Seoul)

藤本 真慈

Fujimoto, S., Ikawa, T., Kina, T., Yokota, Y. : Forced Id2 expression generates NK cells from fully specified T cell precursors in murine fetal thymus. 4th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (2005.4.6-10. Kyoto)

藤本真慈, 喜納辰夫, 横田義史: マウス胎仔胸腺の T 前駆細胞に HLH 因子 Id2 を異所的に発現させると, 子孫細胞の一部が NK 細胞に運命変換する. 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005.12.7-10. 福岡)

藤本真慈, 柿沼志津子, 喜納辰夫: X 線照射により TCRb chain gene rearrangement が亢進する. 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005.12.13-15. 横浜)

再生医学応用研究部門

組織再生応用分野 Department of Tissue Regeneration

分野主任 教授 戸口田 淳也

Prof. Junya Toguchida

【研究概要】

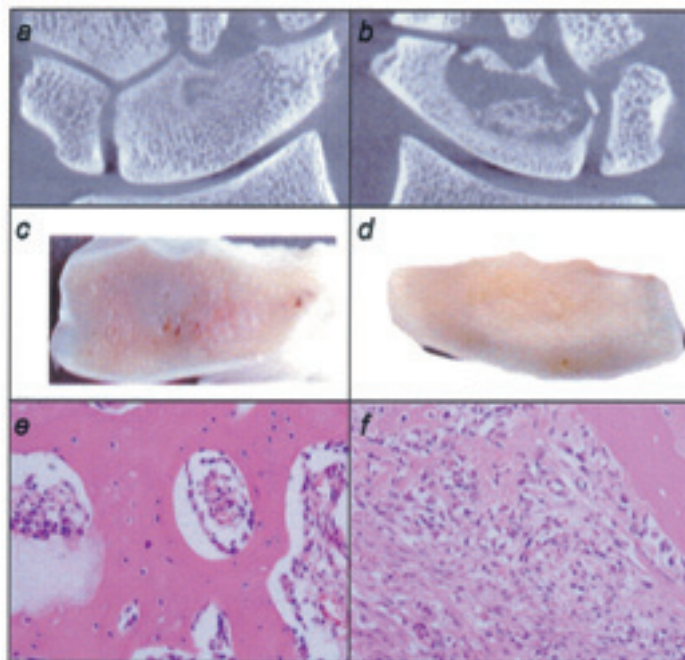
本研究分野の目標は間葉系組織の増殖分化機構を理解し、その成果にもとづいて、間葉系組織の臨床病態に対する新規治療法を開発することである。以下のテーマについて現在研究を遂行している。

1. 間葉系幹細胞の増殖及び分化制御機構の解明

骨髄間質細胞中には、間葉系組織の様々な細胞に分化可能な組織幹細胞である間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)が存在するとされている。しかし MSC の本態に関しては未解明な点が多く、MSC を用いた間葉系組織の再生医療を科学的根拠に基づいた医療とするためには、その理解が必須である。我々は京都大学医学部整形外科科学教室との共同研究として、MSC の初代培養を行い、増殖及び分化能に関する解析を行っている。増殖に関しては、p16 遺伝子発現上昇が増殖抑制の一つの因子であり、RNA 干渉法を用いた発現抑制により増殖を促進できることを見出した。初代 MSC は多様な細胞の集団であるため、分化に関する解析にはシングルセル由来の細胞を用いる必要がある。そのためまず MSC を不活化し、多数のクローンを樹立し、個々のクローンの分化能を比較した。そしてその結果と、FACS による表面マーカーの発現、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングの結果を比較することで、それぞれの分化方向の決定に関与する因子の同定を目指している。

2. 間葉系幹細胞の癌化機構の解析とその監視機構の開発

癌の起源細胞が各組織に存在する組織幹細胞であることを示す報告が相次いでおり、MSC の場合、間葉系組織由来の腫瘍、すなわち肉腫の起源細胞になりうる。実際我々は多くの肉腫が MSC 様の多分化能を持っていることを見出している。更に MSC を含む組織幹細胞は分化成熟した細胞と比較すると遺伝子変異が発生しやすく癌化しやすいことを示唆する結果が報告されている。これらのデータは、MSC を用いた間葉系組織の再生医療の遂行に当たって無視



MSC を用いた犬月状舟状骨の再生実験。左右の月状舟状骨の内部海綿骨を搔爬、更に液体窒素処理を加えた。4 週後のマイクロ CT(a 及び b)、肉眼所見(c 及び d)及び HE 組織像(e 及び f)を示す。MSC を人工骨(β -TCP)と共に充填した側では良好な骨梁が再構築されており(a)、肉眼所見(c)及び組織所見(e)でも骨組織が再生されている。一方、細胞として線維芽細胞を用いた群では、骨梁は粗であり(b)、移植部は線維性組織が充満し骨再生は乏しかった(d 及び f)。

できないものである。我々は MSC から不死化 MSC、そして癌化 MSC を遺伝子導入で作成する実験で、癌化に伴う MSC の分化能の変化を解析した。また実際の MSC の培養過程における癌化の初期変化としての p16 遺伝子のメチル化に注目し、その変異を定量的に解析する方法を開発した。他の遺伝子変異解析を含めて、MSC の癌化監視機構の確立が最終目標である。

3. MSC を用いた難治性病変への新規治療法の開発

MSC を用いた再生医療の具体例として、難治性骨壊死病変の一つである月状骨無腐性壊死(キーンベック病)を想定して動物実験を行っている。イヌの月状舟状骨を液体窒素処理により壊死骨モデルを作成した後、予め採取し培養増殖させ、ウィルスベクターを用いて標識しておいた自家 MSC を人工骨材料と混合した上で、壊死部に充填し、骨組織再生を計った。対象として線維芽細胞を用いた場合は、経時的に圧潰が進行し、術後 4 週でも骨組織の再生は認められなかったのに対し、MSC を用いたものは早期に骨組織が再生され、圧潰することなく強度をもつ月状骨が再生された(図参照)。この結果をもとに臨床治験を開始する予定である。

4. 関節軟骨再生に対するプロスタノイド受容体作動性物質の応用

細胞を用いた再生医療と同時に、薬剤等による *in situ* での組織再生の探求も重要な課題である。我々は生理活性物質であるプロスタグランディン E2(PGE2)に注目し、その関節軟骨病態への応用を検討しており、これまでに成人関節軟骨組織において PGF2 受容体のうち EP2 のみが発現しており、EP2 特異的アゴニストにより、軟骨細胞の増殖が促進されることを見出している。現在、*in vivo* の軟骨損傷モデルを作成し、EP2 特異的アゴニストの治療剤としての有効性を検討している。

(文責 戸口田淳也)

The major objects of our department are to understand the molecular mechanism of growth and differentiation of mesenchymal tissues and to develop new therapeutic modalities for pathological conditions in mesenchymal tissues. Following projects are currently undertaken.

1. Regulation of growth and differentiation potential of mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells (MSC), which reside among the bone marrow stromal cells, have a potential to differentiate to cells of various types. There are, however, still many fundamental features of MSC are missing, and it is crucial for the development of regeneration therapy using MSC as evidence based medicine to understand the basic biology of MSC. In collaboration with the Department of Orthopaedic Surgery in Kyoto University Hospital, we have analyzed the growth and differentiation potential of primary human MSCs. As for the growth regulation, we have found that the level of p16 gene expression was critical and the down-regulation by interfering RNA enhanced the growth of MSC. Because primary-cultured MSCs are a mixture of heterogeneous cell populations, it is crucial to use single cell-derived clones to analyze the differentiation property. Therefore we first immortalized MSCs and established a number of clones, and then analyzed the differentiation potential of each clone. Then we compared these data with other information such as the expression profile of cell surface markers obtained by FAX or the mRNA expression profiling by the microarray analysis, which will disclose the molecular mechanism to determine the differentiation direction.

2. Transformation mechanism of MSC and the establishment of surveillance system for transformation of MSC

Recent reports have suggested that cancer cells were derived from tissue stem cells resided in each tissue, and therefore MSCs are potentially progenitors of malignant tumors developed in the mesenchymal tissues, sarcomas. In fact, we have found that a number of sarcoma cells showed the differentiation potential as MSC *in vitro*. In addition,

several reports indicated that tissue stem cells, including MSC, are susceptible for spontaneous mutations and therefore transformation. These data should not be overlooked to promote the regenerative medicine in mesenchymal tissues using MSC. We have established from MSC to immortalized MSC, and then to transformed MSC by sequential gene transfer and analyzed how the differentiation potential of each MSC differed. As one of important initial mutations, we have focused on the methylation of the p16 gene, and established the method to detect the methylation quantitatively. With additional analyses of other type of mutations, our final goal is to establish the transformation surveillance system of MSC.

3. Development of the new treatment for difficult pathological conditions using MSC

As the example of clinical application of MSC, an animal model of avascular necrosis of lunate bone (Kienbeck disease) is constructed. Canine scapho-lunates are treated with liquid nitrogen to create the necrotic bone, and autologous MSC, which are *in vivo* expanded and labeled by virus vectors, are applied for the defect of treated scapho-lunates with artificial bone materials. The control sides, in which fibroblasts were used as the cell source, showed a progressive collapse and poor bone regeneration at four weeks after operation. In contrast, the MSC-transplanted side showed no deformity and abundant bone tissues (Fig. 1). Based on these experimental data, we are proceeding to start the clinical trial.

4. Application of agonist for the PGE2 receptors for the articular cartilage repair

In addition to the development of cell therapy, it is also important to develop the *in situ* treatment using drugs or small molecular materials. We have focused on prostaglandin E2, which is one of physiological active materials, and investigated the application of PGE2 to the regeneration therapy of articular cartilage. We have found that among four types of PGE2 receptors, only EP2 is strongly expressed in articular cartilage, and the EP2-specific agonist can stimulate the growth of articular cartilage chondrocytes. Therapeutic potentials of the agonist are currently investigated using the defect models *in vivo*.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Aoyama, T., Bojian Liang, B., Okamoto, T., Matsusaki, T., Nishijo, K., Ishibe, T., Yasura, K., Nagayama, S., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes. J. Bone Miner. Res., 20 : 377-89, 2005.

Ishibe, T., Nakayama, T., Okamoto, T., Aoyama, T., Nishijo, K., Roberts Shibata, K. R., Shima, Y., Nagayama, S., Katagiri, T., Nakamura, Y., Nakamura, T., Toguchida, J. Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas : potential application of signal inhibitors to molecular target therapy. Clin. Cancer Res., 11 : 2702-12, 2005.

Handa, T., Nagai, S., Ito, I., Tabuena, R., Shigematsu, M., Hamada, K., Kitaichi, M., Izumi, T., Aoyama, T., Toguchida, J., Mishima M. Polymorphisms of B7 (CD80 and CD86) genes do not affect disease susceptibility to sarcoidosis. Respiration, 72 : 243-8, 2005.

Nagayama, S., Furukawa, C., Katagiri, T., Okamoto, T., Toguchida, J., Aoyama, T., Oyaizu, N., Imamura, M., Toguchida,

- J., Nakamura Y. Therapeutic potential of antibodies against FZD10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas. *Oncogene*, 24 : 3201-12, 2005.
- Nakayama, T., Tsuboyama, T., Toguchida, J., Tanaka, C., Oya, N., Hiraoka, M., Nakamura, T. Recurrence of osteosarcoma after intraoperative radiation therapy. *Orthopedics*, 28 : 1195-7, 2005.
- Ren, X., Inoue, T., Hoshiya, H., Kurimasa, A., Inoue, T., Ayabe, F., Shibata, K., Toguchida J, Oshimura M. A Novel Human Artificial Chromosome Vector Provides Effective Cell Lineage-Specific Transgene Expression in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, in press.
- Matsusaki, T., Aoyama, T., Nishijo, K., Okamoto, T., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida J. Expression of the cadherin-11 gene is a discriminative factor between articular and growth plate chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, in press.
- Otsuka, S., Nishijo, K., Nakayama, T., Aoyama, T., Ishibe, T., Shibata, KR, Shima, Y., Nakamura, T., Otsuka, T., Toguchida, J. A variant of the *SYT-SSX2* fusion gene in a case of synovial sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*, in press.
- Ikeguchi, R., Kakinoki, R., Aoyama, T., Shibata, K. R., Otsuka, S., Fukiage, K., Nishijo, N., Ishibe, T., Shima, T., Otsuki, B., Azuma, T., Tsutsumi, S., Nakayama, T., Otsuka, T., Nakamura, T., Toguchida, J. Regeneration of osteonecrosis of canine scapho-lunate using bone marrow stromal cells : possible therapeutic approach for Kienböck disease. *Cell Transplantation*, in press.
- 青山朋樹, 岡本 健, 戸口田淳也 : 間葉系幹細胞を用いた運動器再生医療の可能性. *リウマチ科*, 33 : 306-311, 2005.

2) 著 書

- 戸口田淳也, 中山富貴 : 骨・軟部腫瘍の遺伝子診断とその意義(岩本幸英編 : 整形外科 Knack&Pitfalls 骨・軟部腫瘍外科の要点と盲点, p70-73), 文光堂, 東京, 2005.
- 中山富貴, 戸口田淳也 : 術中照射療法のコツ(岩本幸英編 : 整形外科 Knack&Pitfalls 骨・軟部腫瘍外科の要点と盲点, p227-231), 文光堂, 東京, 2005.
- 戸口田淳也, 中山富貴, 長山聡 : 遺伝子診断—分子生物学的アプローチ(越智隆弘, 菊地臣一編 : NEW MOOK 整形外科 第18巻 骨・軟部腫瘍, p69-80), 金原出版, 東京, 2005.

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 青山朋樹, 岡本健, 長山聡, 柴田弘太郎, 大塚聖視, 吹上謙一, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也 : ヒストン修飾によるコンドロモジュリン-I 遺伝子発現制御機構の解析. 第18回日本軟骨代謝学会(2005.3.18. 大阪)
- 柴田弘太郎, 青山朋樹, 岡本健, 嶋靖子, 中村孝志, 戸口田淳也 : 間葉系幹細胞における p16 遺伝子発現とその発現抑制による増殖促進効果について. 第18回日本軟骨代謝学会(2005.3.19. 大阪)
- 石部達也, 中山富貴, 岡本健, 長山聡, 青山朋樹, 柴田弘太郎, ロバーツ, 嶋靖子, 中村孝志, 戸口田淳也 : 滑膜肉腫の細胞起源および分化誘導療法の可能性について. 第38回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2005.7.21. 横浜)
- 嶋靖子, 岡本健, 石部達也, 青山朋樹, 西庄功一, 柴田弘太郎, 中山富貴, 中村孝志, 清野透, 戸口田淳也 : 骨髄

- 間葉系幹細胞の癌化と分化の関連性について、第38回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2005.7.21. 横浜)
- 西庄功一, 中山富貴, 青山朋樹, 石部達也, 嶋靖子, 柴田弘太郎, 中村孝志, 戸口田淳也: 骨肉腫における骨分化形質発現における Wnt/ β catenin 経路の役割. 第38回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2005.7.21. 横浜)
- 大塚聖視, 青山朋樹, 柴田弘太郎, ロバーツ, 吹上謙一, 中山富貴, 中村孝志, 大塚隆信, 戸口田淳也: 骨肉腫細胞の分化能の可塑性とその制御機構について. 第38回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2005.7.21. 横浜)
- 中山富貴, 坪山直生, 戸口田淳也, 足立莊一, 平松英文, 小林道弘, 中村孝志: 四肢骨肉腫に対する Etoposide を使用した化学療法の成績. 第38回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2005.7.22. 横浜)
- 坪山直生, 笠原勝幸, 鬼木浩二, 戸口田淳也, 中山富貴, 中村孝志: 下肢悪性種横治療後長期生存者の自己健康評価. 第38回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2005.7.22. 横浜)
- 大塚聖視, 青山朋樹, 柴田弘太郎, 吹上謙一, 池口良輔, 柿木良介, 中村孝志, 大塚隆信, 戸口田淳也: 無腐性壊死病態に対する間葉系幹細胞を用いた治療法の開発. 第8回組織工学学会(2005.9.1. 東京)
- 保坂泰介, 戸口田淳也, 中村孝志, Webster K Cavenee, Karen C Arden: 転写因子 Foxo1 の生理的及び腫瘍新生血管における発現解析. 第64回日本癌学会総会(2005.9.14. 札幌)
- 福川千香子, 長山聡, 片桐豊雅, 戸口田淳也, 中村祐輔: 滑膜肉腫特異的に発現亢進が認められる遺伝子 FZD10 の機能解析およびその抗体治療としての可能性の検討. 第64回日本癌学会総会(2005.9.14. 札幌)
- 大塚聖視, 中山富貴, 西庄功一, 青山朋樹, 石部達也, 柴田弘太郎, ロバーツ, 嶋靖子, 中村孝志, 大塚隆信, 戸口田淳也: SYT-SSX2 融合遺伝子の新規. 第64回日本癌学会総会(2005.9.14. 札幌)
- 西庄功一, 中山富貴, 山朋樹, 石部達也, 嶋靖子, 柴田弘太郎, 中村孝志, 戸口田淳也: p53 欠損骨芽細胞 MMC 2 の脱分化過程における Wnt/ β catenin 経路の役割. 第64回日本癌学会総会(2005.9.14. 札幌)
- 石部達也, 中山富貴, 長山聡, 岡本健, 青山朋樹, 西庄功一, 柴田弘太郎, 嶋靖子, 中村孝志, 戸口田淳也: 遺伝子発現と多分化能からみた滑膜肉腫細胞と神経堤細胞の類似性. 第64回日本癌学会総会(2005.9.15. 札幌)
- 嶋靖子, 岡本健, 青山朋樹, 西庄功一, 石部達也, 柴田弘太郎, 中山富貴, 中村孝志, 清野透, 戸口田淳也: 骨髄間葉系幹細胞の癌化過程と分化能の関連性について. 第64回日本癌学会総会(2005.9.15. 札幌)
- 松原央, 足立莊一, 今井剛, 水嶋康浩, 渡部基信, 西庄功一, 戸口田淳也, 中畑龍俊: Depsipeptide 耐性株の樹立と PI3K inhibitor による耐性克服. 第64回日本癌学会総会(2005.9.15. 札幌)
- Aoyama, T., Linag, B., Matsusaki, T., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J.: PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes. 27Annual meeting of the ASBMR(2005.9.24. Nashville)
- 石部達也, 中山富貴, 長山聡, 青山朋樹, 中村孝志, 戸口田淳也: 滑膜肉腫細胞の多分化能は神経堤細胞起源を示唆する. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会(2005.10.20. 伊勢)
- 嶋靖子, 岡本健, 中山富貴, 中村孝志, 清野透, 戸口田淳也: 骨髄間葉系幹細胞の癌化と分化の関連性について. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会(2005.10.20. 伊勢)
- 大塚聖視, 青山朋樹, 柿木良介, 中村孝志, 大塚隆信, 戸口田淳也: キーンバック病モデルに対する間葉系幹細胞を用いた細胞治療. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会(2005.10.20. 伊勢)
- 柴田弘太郎, 青山朋樹, 岡本健, 石部達也, 中村孝志, 戸口田淳也: 間葉系幹細胞における p16 遺伝子発現とその発現抑制による増殖促進効果について. 第20回日本整形外科学会基礎学術集会(2005.10.20. 伊勢)

青山朋樹, 松崎尚志, 西庄功一, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 成長軟骨板における石灰化関連遺伝子の同定.

第20回日本整形外科学会基礎学術集会(2005.10.21. 伊勢)

中山富貴, 戸口田淳也: 分子遺伝学的診断と今後の課題. 第43回日本癌治療学会総会(2005.10.25. 名古屋)

Ishibe, T., Nakayama, T., Aoyama, T., Nishijo, K., Shibata, K.R., Shima, Y., Otsuka, S., Nagayama, S., Nakamura, T., Toguchida, J.: Gene-expression pattern and differentiation potential of synovial sarcoma suggest its cellular origin as neural crest-derived cell. 11th CTOS (2005.11.29. Boca Raton)

Otsuka, S., Aoyama, T., Ishibe, T., Shibata, K.R., Shima, Y., Fukiage, K., Nakayama, T., Nakamura, T., Otsuka, T., Toguchida, J.: Differentiation potency and plasticity as mesenchymal stem cells of osteosarcomas. 11th CTOS (2005.11.29. Boca Raton)

Nishijo, K., Nakayama, T., Aoyama, T., Ishibe, T., Shima, Y., Shibata, K.R., Nakamura, T., Toguchida, J.: Involvement of Wnt-b-catenin pathway in the de-differentiation process of murine osteosarcomas. 11th CTOS (2005.11.29. Boca Raton)

戸口田淳也, 中山富貴, 保坂泰介, 中村孝志: 腫瘍整形外科における生体材料治療の現況と期待. 第27回日本バイオマテリアル学会大会(2005.11.29. 京都)

光野芳樹, 石部達也, 長山聡, 西庄功一, 青山朋樹, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 滑膜肉腫における上皮構造形成に関するクローニン遺伝子群の解析. 第28回日本分子生物学会年会(2005.12.7. 福岡)

大塚聖視, 青山朋樹, 柴田弘太郎, ロバーツ, 吹上謙一, 中山富貴, 中村孝志, 大塚隆信, 戸口田淳也: 骨肉腫細胞の分化能の可塑性とその制御機構について. 第28回日本分子生物学会年会(2005.12.7. 福岡)

青山朋樹, 松崎尚志, 西庄功一, 岡本健, 石部達也, 柴田弘太郎, 大塚聖視, 嶋靖子, 中山富貴, 中村孝志, 戸口田淳也: 成長軟骨板における石灰化関連遺伝子の同定. 第28回日本分子生物学会年会(2005.12.9. 福岡)

柴田弘太郎, 青山朋樹, 吹上謙一, 大塚聖視, 藤林俊介, 根尾昌志, 中村孝志, 戸口田淳也: Expression of the p16INK4A gene in mesenchymal stem cells and the effect of down regulation on the cell growth. 第28回日本分子生物学会年会(2005.12.9. 福岡)

2) 講演・シンポジウム

戸口田淳也: 間葉系幹細胞の関する期待と疑問. 東京医科歯科大学 21 世紀 COE プログラム(2005.2.17. 東京)

戸口田淳也: 間葉系幹細胞の関する期待と疑問. 2004 年度医工学フォーラム(2005.2.23. 京都)

戸口田淳也: 骨軟部腫瘍の遺伝子発現解析: 診断治療への応用に向けて. 第3回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会(2005.4.9. 東京)

戸口田淳也: 骨軟部腫瘍における遺伝子解析の臨床応用. 第14回近整会夏期研修会(2005.8.27. 淡路島)

戸口田淳也: 骨軟部腫瘍: 遺伝子診断と再生医療の応用. 第33回岡山県整形外科勤務医会(2005.9.3. 岡山)

器官形成応用分野 Department of Organ Reconstruction

助教授 角 昭一郎

Assoc. Prof. Shoichiro Sumi

【研究概要】

本分野では、膵 Langerhans 島(膵島)の再生医療を中心的な研究テーマとしており、全世界で増加している糖尿病に対して、希望すればいつでも受けられる安全で根治的な治療法の開発を目指して研究を行っている。重症糖尿病治療は主としてインスリン補充療法に依存しているが、欧米をはじめ、我が国でも、重症糖尿病に対する根治的な治療法である膵臓や膵島の移植が着実に増加してきている。しかし、移植医療に共通するドナー不足と永続的な免疫抑制療法の問題は避けられず、いつでも受けられる安全な治療法という理想からは大きな隔たりがある。また、ここ数年、低侵襲の移植医療として大きな期待を担ってきた膵島移植も、実施施設間の成績のばらつきや、長期的な有効性に疑問が持たれるなど、なお解決されるべき問題が多い。

膵島再生医療のアプローチとして、最も直接的に自己の膵島再生を促進する方法、自己または他者に由来する組織幹細胞あるいは胚生幹(ES)細胞から膵島様細胞を分化誘導する方法、さらに、ヒト以外の異種動物の膵島を分離して利用する方法などを研究している。これらの方法が応用できれば、ドナー不足の問題は解決する。しかし、患者自身に由来する細胞を使用するのでなければ拒絶反応の対象となり、また、治療対象疾患が自己免疫の関与する1型(インスリン依存性)糖尿病であることを考慮すると、膵島や膵島様細胞を患者の免疫機構から保護する対策が必要である。本分野では、膵島や膵島様細胞を、免疫隔離能を有する各種の半透膜で包んでバイオ人工膵を作成することによって、免疫抑制を行うことなく細胞を保護する研究を行っている。このようなバイオ人工膵が臨床に応用できるようになれば、重症糖尿病に対する有力な治療法となり得る。

本分野では、ラットやブタの膵島分離法を確立し、これらを用いて各種のバイオ人工膵の研究開発を行ってきた。例えば、生体適合性に優れたポリビニルアルコール(PVA)膜をメッシュ補強して作製したチューブ状あるいはバッグ状のデバイスに膵島やインスリン分泌細胞を封入して移植することで、異種動物の血糖を長期にコントロールできること、アガロースと抗補体作用を有するポリスチレンスルホン酸の混合ゲルにラット膵島やブタ膵内分泌細胞を包埋して棒型バイオ人工膵を作製し、あらかじめ血管誘導処置を施したストレプトゾトシン(STZ)糖尿病マウスの皮下に異種移植することで長期の血糖正常化が達成されることなどを報告してきた。しかし、これらの製法では、イヌなど大型動物や最終的な目標であるヒトに応用可能な大型のバイオ人工膵を作製することは必ずしも容易ではなかったため、我々は全く新しい独自のバイオ人工膵作成技術として、膵島の凍結保存法と、PVAが凍結によって安定したゲル状になることを組み合わせた作製法を開発した。具体的には、膵島凍結液で溶解したPVAの溶液に膵島を浮遊させ、この液体をメッシュで補強してシート状に成形した後、凍結・溶解してゲル状のバイオ人工膵シートを作成した。この方法によれば、原理的には面積や厚さを自由にコントロールすることが可能で、将来の大型化に大きく道を拓くものと考えている。本年は、このバイオ人工膵を用いてラットから重症糖尿病マウスへの異種膵島移植を行うと、必ずしも血糖の正常化が得られない場合であっても、生存率を改善し、糖尿病性腎障害の進展を有意に抑制できることを示した。膵臓や膵島移植の適応になる実際の重症糖尿病患者さんは、インスリン分泌能が廃絶しているため、血糖コントロールが著しく不安定となり、血糖を正常に保とうとすればするほど、重症の

低血糖発作に襲われる危険が増大する。今回の実験結果は、バイオ人工膵移植によってインスリンの基礎分泌を確保できれば、必ずしも長期的な血糖正常化が得られない場合であっても、ケトアシドーシスの防止や腎障害の予防に一定の効果があることを示唆しており、臨床応用の際の治療目標を考えるのに大きなヒントとなるものである。

また、膵島移植やバイオ人工膵の有効性を阻害する現象として、 β 細胞のアポトーシスが注目されているが、本年の研究成果として、臓器保存液として汎用されている UW 液 (University of Wisconsin solution) 中でラット分離膵島を冷保存すると、アポトーシスが抑制され、通常の培養条件に比べて膵島の形態および機能が有意に良好に保存されることを見いだした。但し、Bax/Bcl-2 比でみると、膵島分離の直後からアポトーシスに向かう傾向がすでにみられており、必ずしも冷保存のみでこれに対処できる訳ではないことも示唆された。この結果は、現実的な問題として、すでに米国などで行われている遠隔地での膵島分離と分離膵島の輸送に、UW 液による冷保存が応用できる可能性を示唆している。また、一方で、従来から経験的には知られていた膵島分離の技術的レベルと移植効果の関連について、アポトーシスの観点からさらなる検討が可能であることも示唆しており、興味深い知見と思われる。

その他の関連領域として、バイオ人工膵の皮下移植や、閉塞性動脈硬化症など虚血性疾患の治療に応用する目的で、血管新生誘導の基礎的研究を行っている。本年は、ラット背部の虚血皮弁モデルを用いて、フィブリンや抗狭心症薬であるニコランジルの効果を確認した。また、マウス ES 細胞を用いた研究では、膵島様細胞塊の誘導をすでに報告しているが、さらにドパミン産生神経細胞の誘導に成功し、これを用いた移植実験において有効性を確認した。さらに、糖尿病の病態研究や、モデル予測による機械的人工膵臓の制御を視野に置いて、全身糖代謝シミュレータの構築を目指した研究も、京都大学工学研究科との共同で進行中であり、本年は人工膵を装着した麻酔下犬を用いて基礎的なデータ収集を行い、今後、これを用いてモデル構築の作業に移行する計画である。

The major object of our laboratory is development of regenerative medicine for diabetes mellitus from which growing number of patients are suffering in the world. The goal of our studies is to establish a safe therapy available for every diabetes patient whenever it is required. Therapy for severe diabetes mellitus still depends mostly on insulin injection. In Japan as well as western countries, an increasing number of patients are treated by pancreas organ transplantation and islet transplantation. However, donor shortage and complications due to immunosuppressive therapy are inevitable problems as long as allo-transplantation of human organs is employed. In addition, islet transplantation that seemed promising during last few years has become less attractive because the duration of the insulin-free period after transplantation was found to be rather short and the big difference in outcome between facilities has become clear. Due to these problems, current transplantation therapy is still far from the goal of our studies.

In order to solve these problems, we can take several different approaches including enhancement of patient's own islet regeneration, auto- or allo-geneic islet-like cells differentiated from somatic or embryonic stem cells *in vitro* and xeno-geneic islets isolated from the pancreas of animals such as pigs. If these cells become clinically usable, donor shortage will be solved. However, if allo-geneic cells are used and if you consider that type-1 diabetes is an autoimmune disease, some kind of immunosuppression should be required even in the situation of auto-transplantation. In order to avoid necessity of immunosuppression, we are diligently studying bio-artificial pancreas, in which islet cells are encapsulated by several kinds of semi-permeable membrane and protected from host immune responses.

We have established isolation method of porcine pancreatic endocrine cells as well as rat islets. Using these islets, we have successfully shown the efficacy of several macro-devices of bioartificial pancreas such as mesh-reinforced

polyvinyl alcohol (PVA) tube and bag, rod-shaped device of agarose containing anti-complement substance, and so on in allo- and xeno-geneic situations. In these experiments, we became aware of a difficulty in making bigger devices to be used for large experimental animals and human patients. Therefore, we recently developed a novel method to make sheet type macro-devices of PVA gel by freezing and thawing method that can, at least theoretically, be applied to make a device of any size with any shape. This method is based on two facts that islet can be stored by freezing and that aqueous solution of PVA becomes gelled by freezing and thawing. Using this macro-device, we recently showed that implantation of xeno-geneic bioartificial pancreas can improve the survival of insulin-dependent diabetic mice and relieves diabetic renal dysfunction even though long-term normoglycemia is not achieved.

Other related researches are as follows. We studied the cold storage of islets in University of Wisconsin solution and showed that such cold storage can decrease the incidence of apoptosis in comparison to storage in warm culture condition. We are studying several methods to induce neovascularization to ischemic tissues including ischemic skin flap on the back of rats and showed that fibrin and antianginal agent, Nicorandil, can improve the viability of the flap, respectively. We have made dopaminergic neuron-like cells from mouse ES cells and showed a effects of these cells when transplanted into the brain of Parkinsonism model rat. In addition, we are studying to establish a simulator of systemic glucose metabolism for a possible use to control mechanical artificial pancreas.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Inden M, Kim D, Qi M, Kitamura Y, Yanagisawa D, Nishimura K, Tsuchiya D, Tanaka K, Hayashi K, Taniguchi T, Yoshimoto K, Shimohara S, Sumi S, Inoue K. Transplantation of mouse embryonic stem cell-derived neurons into the striatum, subthalamic nucleus and substantia nigra, and behavioral recovery in hemiparkinsonian rats. *Neuroscience letters* 287 : 151-156 (2005)
- Shirouzu Y, Gu Y, Koga M, Sakurai T, Qi M, Hiura A, Sumi S, Inoue K. Cold preservation of islets in UW solution -with special reference to apoptosis. *J Surg Res* (in press)
- Sakata N, Gu Y, Qi M, Yamamoto C, Hiura A, Sumi S, Sunamura M, Matsuno S, Inoue K. Effect of rat-to-mouse bio-artificial pancreas xenotransplantation on diabetic renal damage and survival. *Pancreas* (in press)
- 角 昭一郎, 井上一知, 遠藤真一郎, 北村義則: ラット膵管結紮と切除の影響に関する研究(第2報). 胆膵の生理機能 21(1) : 53-58, 2005

2) 著 書

- 角 昭一郎: 腹腔内臓器以外に由来する「腹痛」. 「腹痛診療のコツと落とし穴」(寺野 彰 編, 中山書店, 東京)p156-157, (2005)

3) 総 説

- 角 昭一郎 膵・膵島移植と人工臓器 移植 40(2) : 122-128(2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

奇 梅日更, 角 昭一郎, 井上一知: COPAS を用いた膵島の分離・純化に関する検討. 第 32 回膵・膵島移植研究会 (2005.3.18-19. 福岡)

奇 梅日更, 漆 智, 古賀まり, 日裏彰人, 角 昭一郎, 井上一知: PVA を用いたシート型マクロカプセル化膵島に関する検討. 第 8 回日本異種移植研究会 (2005.3.5. 榎原)

角 昭一郎, 奇 梅日更, 顧 元駿, 坂田直昭, 白水泰昌, 日裏彰人, 井上一知: polyvinyl alcohol 凍結「ゲル化」法によるシート型カプセル化膵島. 第 36 回日本臓器学会大会 (2005.7.28-29. 東京)

Sumi S, Qi Z, Yanai G, Imori N, Koga M, Satake A, Hiura A, Inoue K. : Exocrine insufficiency is not enough to maintain pancreatic regeneration in rats. American Pancreatic Association. (2005.11.3-4. Chicago, Illinois, USA)

2) 講演・シンポジウム

角 昭一郎: 重症糖尿病治療の現状と膵島再生医療の展望. 医工学フォーラム「2004 年度特別学術講演会」 (2005.2.23. 京都)

角 昭一郎: 再生医療 実用化の現況と将来展望. 第 32 回日本集中治療学会学術集会 (2005.2.25. 東京)

角 昭一郎: 運動・外傷と再生医療—現況と展望—. 関西医大グループ勉強会 (2005.4.16. 京都)

角 昭一郎: バイオ人工臓—私どもの経験—. 岡山大学外科講演会 (2005.9.5. 岡山)

角 昭一郎: 糖尿病治療 新しい治療法の現況(膵臓・膵島の移植, 人工膵臓). 「医薬ライセンシング協会」 (2005.12.21. 東京)

臓器再建応用分野
Department of Bioartificial Organs

助教授 中村 達雄
Assoc. Prof. Tatsuo Nakamura

【研究概要】

臓器再建応用分野の研究目的は, 新しい *in situ* Tissue Engineering や再生医学を用いて人間の幸福に貢献することとあります. これによって, 現在治療法がない難病患者, 人工臓器で延命中の患者, 或いは移植ドナーの不足のために治療が受けられない症例の多くが救われることを目指します. さらに, 高騰を続ける医療費が再生医療が普及することにより激減し社会に貢献すると考えています.

人間の体には秘められた再生能があります. それを引き出す新しい手法を開発しています. すなわち, 自己の細胞が増殖, 分化できる足場となる適切な環境を体内に与えることによって, 自己の臓器が本来の構造と機能を取り戻して再生復元するようにしています. 研究の方法としては, 再生医学の 3 つの柱である (1) 足場, (2) 細胞, (3)

増殖・成長因子，を生体内で働かせる *in situ* Tissue Engineering という方法を独自に開発してそれを進めています。すなわち，同種・異種の臓器や組織から酵素で分解・抽出して完全に免疫原性をなくしたコラーゲンから再構成した細胞外マトリックス，或いは Detergent で細胞を完全に除去した細胞外マトリックス，生体内で分解吸収される合成高分子，増殖因子など DDS(薬物送達システム)を組み合わせて，欠落した組織や臓器の再生する足場となる枠組み(細胞外マトリックス)を生体内に作ります。この枠組みを足場として利用して，生体内の幹細胞が増殖，分化し，自己の組織や臓器が再生復元されます。また，幹細胞の分離・増殖を行い組織再生に用いる研究や癰痕状になった細胞外マトリックスを融かして，再び本来の細胞外マトリックスに戻す研究も進めています。

現在行っている研究内容は下記のように分類されます。

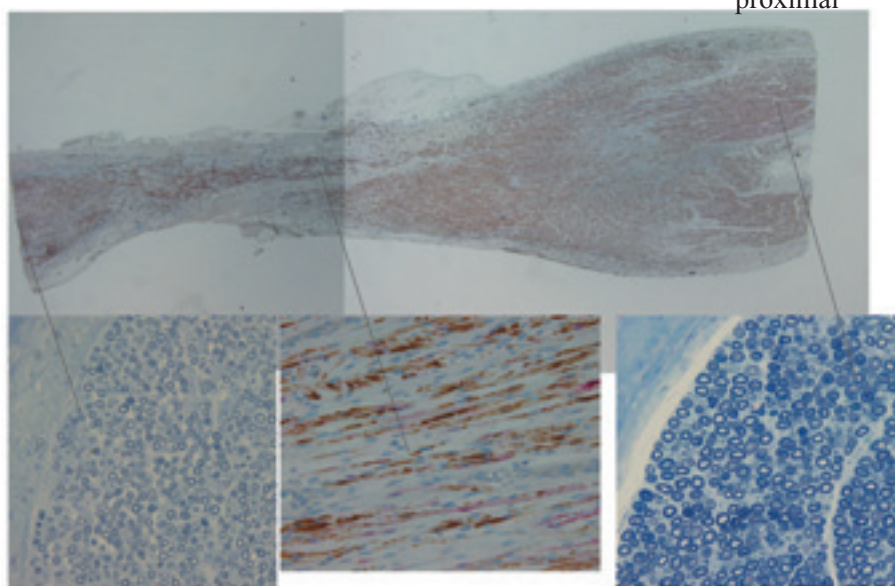
- ①角膜，心膜，胸膜，腹膜，脳硬膜などの膜系
- ②血管，気管，喉頭，消化管などの管状臓器
- ③外力の加わる組織(骨，永久歯，歯根膜)
- ④末梢神経
- ⑤脊髄・大脳などの中枢神経系
- ⑥泌尿器系組織
- ⑦肺臓，肝臓，甲状腺，上皮小体，脾臓などの実質性代謝臓器
- ⑧脂肪組織や筋肉組織や，その他軟組織
- ⑨この他に人工臓器の開発や造影剤の研究，バイオマテリアルの研究

当分野の研究は，細胞が増殖，再分化して，元の臓器を復元させる“場”(環境)を人工的に体の中に作れば，哺乳動物の臓器や組織もいもりのように再生復元するというメカニズムを医学に応用するものです。このような *in situ* Tissue Engineering は世界に先駆けて我々が提唱してきた方法で既に人工気管や人工神経など臨床に応用されています。この新しい技術は 21 世紀の医療の中心的柱になると考えています。

Dog#115

坐骨神経再建 1 年後 (371 日) 病理所見

proximal



人工神経管を用いて犬の坐骨神経を再建すると一年後には中枢側から末梢に神経軸索が再生する。運動機能、感覚も回復し再生神経が機能的にも効能があることを動物実験で確認している。

In situ Tissue Engineering : We have devised a completely new approach to the development of artificial organs. The main procedure using tissue engineering for tissues and internal organs involves the removal of the cell component from auto- or allo-organs to obtain only the extracellular matrix, so-called refined extracellular matrix (ECM) and reconstitutes the solid structure from the extracted collagen. This ECM or reconstituted structure is then employed as scaffolding, which after implantation into the patients is used for the regeneration or re-differentiation of tissue. Organs made of self-cells thus regenerate. Organs that regenerate in this manner not only possess highly differentiated tissue structures, but also show functional recovery, because all the cells are derived from the patients themselves. Whether or not our new method is practicable will depend mainly on the intrinsic regeneration capacity of each tissue. Up to now, in higher mammals including man, it has been believed that highly differentiated organs lose their ability to regenerate. We consider that mammals do not, in fact, lose this potential, and that the potential is hidden by excessively rapid wound healing around the failing tissues. In this sense, if we can provide good conditions using refined ECM, we can induce this hidden potential even in higher mammals. We have already carried out successful trials at regenerating peripheral nerves, the esophagus, the trachea, and blood vessels with this method. A similar method is also applicable to other soft tissue organs such as the liver, heart, and lung, as well as the spinal cord. These results will be welcomed by patients who are dependent on palliative life-support systems, or transplantation candidates who are waiting for suitable donors. An additional benefit is that patients will be freed from the side effects of immunosuppressive drugs. The judgment of the brain death can then be discussed separately from the issue of transplantation, and will become a personal problem. Further more, this new approach help to reduce ever-expanding medical costs, which are in danger of destroying our health insurance system in the near future.

No study based on these concepts has ever been done either in Japan or abroad. In this sense, our pioneering work is expected to be a major area of medical science for the coming generation.

Strategy and targets of our study

The target organs currently being considered for this development project are the heart, heart valves, esophagus, stomach, intestine, gallbladder, trachea, lung, liver, kidney, peripheral nerves, spinal cord, cornea, tendons, ligaments, cartilage, bone, fatty tissue, periodontal tissue, and permanent teeth. We plan to employ the two major methods as described below.

ECM Method

To obtain the purified extracellular matrix, cell components are completely removed from homo or allo-organs. The solid structure is reconstituted from the ECM and extracted collagen. Growth factors are then applied to facilitate cell proliferation. Then this ECM-collagen-growth factor composite is implanted into the living body as a temporary scaffolding for new organ regeneration. Besides this, bioabsorbable materials will also be applied instead of purified ECM as a bulk structure for organ regeneration. Both extracted collagen and growth factors are should facilitate cell proliferation and cell redifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

Cell+ECM Method

Cells (or living tissues) of patients are complexed (mixed) with purified ECM or bioabsorbable material. Using this complex, reconstruction of the failing tissues or organs will be attempted. Mesenchymal stem cell (MSC) obtained from the bone marrow is now applied to this method.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

中村達雄：気道の再生.呼吸と循環. **53** : 119-125 (2005)

Inada, Y., Morimoto, S., Moroi, K., Endo, K., Nakamura, T. : Surgical relief of causalgia with an artificial nerve guide tube : Successful surgical treatment of causalgia (Complex Regional Pain Syndrome Type II) by in situ tissue engineering with a polyglycolic acid-collagen tube. *Pain* **117** : 251-258 (2005)

稲田有史, 中村達雄, 森本 茂, 飯田秀之, 古家 仁, 諸井慶七郎：人工神経移植術を用いた末梢神経生体内再建法. 末梢神経再建—up date—PEPARS **3** : 12-17 (2005)

高橋 充, 加藤治文, 中村達雄, 清水慶彦：EPC による肺高血圧の治療.呼吸と循環. **53** : 159-165 (2005)

Nakase, Y., Hagiwara, A., Nakamura, T., Kin, S., Nakashima, S., Yoshikawa, T., Fukuda, K., Kuriu, Y., Miyagawa, K., Sakakura, C., Otsuji, E., Shimizu, Y., Ikada, Y., Yamagishi, H.: Tissue engineering of small intestinal tissue using collagen sponge scaffolds seeded with smooth muscle cells. *Tissue Eng.* (in press)

中原 貴, 中村達雄, 小林英三郎, 呉本晃一, 松野智宣, 田畑泰彦, 江藤一洋, 清水慶彦：歯根膜由来細胞播種による歯周組織の *In situ* ティッシュ・エンジニアリング. 歯科臨床研究. **2** : 28-34 (2005)

野田澤俊介, 中村達雄, 清水慶彦, 瀧川敏算：メッシュ型人工気管の力学特性 (Mechanical properties of mesh-type artificial tracheas.). 材料. **54** : 85-89 (2005)

Fukuda, S., Nakamura, T., Kishigami, Y., Endo, K., Azuma, T., Fujikawa, T., Tsutsumi, S., Shimizu, Y. : New canine spinal cord injury model free from laminectomy. *Brain Research Protocols*. **14** : 171-180 (2005)

Morino, S., Nakamura, T., Toba, T., Takahashi, M., Kushibiki, T., Tabata, Y., Shimizu, Y. : Fibroblast growth factor-2 induces recovery of pulmonary blood flow in canine emphysema models. *CHEST*. **128** : 920-926 (2005)

森野茂行, 鳥羽紀成, 高橋 充, 永安 武, 中村達雄：肺気腫のグロースファクターによる治療. 呼吸と循環. **53** : 141-147 (2005)

Lynn, A.K., Nakamura, T., Patel, N., Porter, A.E., Renouf, A.C., Laity, P.R., Best, S.M., Cameron, R.E., Shimizu, Y., Bonfield, W. : Composition-controlled nanocomposites of apatite and collagen incorporating silicon as an osseopromotive agent. *J Biomed Mater Res*. **74A** : 447-453 (2005)

Miyake, K., Hayakawa, K., Nishino, M., Morimoto, T., Mukaihara, S. : Effects of oral 5-fluorouracil drugs on hepatic fat content in patients with colon cancer. *Acad Radiol*. **12** : 722-727 (2005)

Nishino, M., Iwata, S., Hayakawa, K., Kanao, S., Morimoto, T., Mukaihara, S., Hatabu, H. : Functional evaluation of the postoperative gastrointestinal tract using kinematic MR imaging : Quantitative assessment of peristaltic activity. *European Journal of Radiology*. **53** : 263-267 (2005)

Nishino, M., Togashi, K., Nakai, A., Hayakawa, K., Kanao, S., Iwasaku, K., Fujii, S. : Uterine contractions evaluated on cine MR imaging in patients with uterine leiomyomas. *European Journal of Radiology*. **53** : 142-146 (2005)

2) 著 書

中村達雄, 茂野啓示：確立した再生医療の基本コンセプト, 「新・一から学ぶ歯周外科の手技」(茂野啓示：著, 医歯薬出版)356-361(2005)

- 稲田有史, 中村達雄: 末梢神経損傷に対する生体内再生治療—Polyglycolic Acid-Collagen Tube による CRPS Type II の外科的治療—, 痛み治療のアプローチ(編集/小川節郎, 真興交易(株)医書出版部)94-112(2005)
- 茂野啓示:「新・一から学ぶ歯周外科の手技」(茂野啓示:著, 医歯薬出版)(2005)
- 藤川孝満, 福田正順, 森野茂行, 稲田有史, 中村達雄, 清水慶彦: 再生医療と理学療法の接点, メディカルプレス 22 (in press)
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 中村達雄: 神経の再生と再生医療, 第2回香川泌尿器疾患フォーラム(2005.2.15. 高松)
- Nakamura, T., Fukuda, S., Nakada, A., Kobayashi, T., Itoi, S., Inada, Y., Endo, K., Shigeno, K., Kanemaru, S., Tao, H., Kin, S., Nakase, Y.: Peripheral nerve regeneration on an artificial nerve (Biodegradable nerve guide tube). American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference (2005.6.9-11. Washington, DC)
- Itoi, S., Endo, K., Inada, Y., Fukuda, S., Nakada, A., Ichihara, S., Nakamura, T.: Peripheral nerve regeneration using a polyglycolic acid-collagen tube, comparison with an autograft. European Society for Artificial Organs XXXII Congress (2005.10.5-8. Bologna)
- 稲田有史, 中村達雄: 指尖再建—生体内再生治療 vs Ultra-micro-surgery. 第48回日本手の外科学会学術集会(2005.4.21-22. 下関)
- 稲田有史, 中村達雄, 遠藤克昭, 森本 茂: PGA-Collagen tube による母指指神経再建例の検討. 第48回日本手の外科学会学術集会(2005.4.21-22. 下関)
- 上田寛樹, 中村達雄, 福田正順, 田畑泰彦: 骨組織再生に用いるコラーゲンスポンジのポアサイズの影響, 第27回日本バイオマテリアル学会大会(2005.11.28-29. 京都)
- 金丸眞一, 大森孝一, 山下 勝, Magrufov Akhmar, 平海晴一, 中村達雄, 伊藤壽一: 高度慢性中耳炎における組織工学的アプローチ, 第26回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)
- 金 修一, 中瀬有遠, 中島 晋, 吉川徹二, 栗生宜明, 福田賢一郎, 宮川公治, 大辻英吾, 阪倉長平, 萩原明於, 中村達雄, 清水慶彦, 山岸久一: 肛門機能再生のための骨格筋組織再生の試み, 第105回日本外科学会定期学術集会(2005.5.11-13. 名古屋)
- Kin, S., Nakase, Y., Hagiwara, A., Nakamura, T., Shimizu, Y., Yamagishi, H.: Experimental study in skeletal muscle regeneration using collagen sponge scaffold in rabbits. American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference (2005.6.9-11. Washington, DC)
- 金 修一, 萩原明於, 中瀬有遠, 中島 晋, 吉川徹二, 阪倉長平, 大辻英吾, 中村達雄, 山岸久一: 肛門機能再生を目指した骨格筋組織再生の試み, 第26回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)
- 金 修一, 中瀬有遠, 中島 晋, 吉川徹二, 栗生宜明, 福田賢一郎, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 中村達雄, 山岸久一: 排便機能再生を目指した骨格筋組織再生の試み, 第64回日本癌学会(2005.9.14-16. 札幌)
- Kin, S., Hagiwara, A., Nakase, T., Kuriu, Y., Nakashima, S., Yoshikawa, T., Sakakura, C., Otsuji, E., Nakamura, T., Yamagishi, H.: In situ tissue engineering for the skeletal muscle regeneration using a collagen scaffold in a rabbit mode. European Society for Artificial Organs XXXII Congress (2005.10.5-8. Bologna)

- 金 修一, 中瀬有遠, 中島 晋, 吉川徹二, 栗生宜明, 福田賢一郎, 宮川公治, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 中村達雄, 山岸久一: 肛門機能再生に向けた骨格筋組織再生の基礎的検討. 第 43 回日本癌治療学会, 第 1 回癌治療への再生医療応用研究会(2005.10.26. 名古屋)
- 茂野啓示: 歯科口腔外科と組織工学. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会(2005.11.28-29. 京都)
- Tao, H., Nakamura, T., Morino, S.: Bronchoscopic treatment of postoperative bronchopleural fistulas using collagen sponge spigots. American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference (2005.6.9-11. Washington, DC)
- 田尾裕之, 中村達雄, 森野茂行, 福田正順, 中田 顕, 市原理司: ラット肺実質への自己骨髄培養細胞移植. 第 26 回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)
- 高橋 充, 木村雅一, 鳥羽紀成, 森野茂行, 梶原直央, 内田 修, 宮島邦治, 長束美貴, 鈴木明彦, 松野智宣, 佐藤田鶴子, 中村達雄, 加藤治文: 呼吸器外科領域に関する再生医工学の応用. 第 30 回日本外科系連合学会学術集会(2005.6.24-25. 東京)
- 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 金 修一, 中瀬有遠, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: in situ Tissue Engineering による総胆管再生の試み. 第 26 回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)
- 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 金 修一, 中瀬有遠, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: in situ Tissue Engineering による総胆管再生の試み. 第 60 回日本消化器外科学会定期学術総会(2005.7.20-22. 東京)
- 中島 晋, 中村達雄, 吉川徹二, 金 修一, 中瀬有遠, 阪倉長平, 大辻英吾, 萩原明於, 山岸久一: in situ Tissue Engineering による肝外胆管再生の試み. 第 64 回日本癌学会学術総会(2005.9.14-16. 札幌)
- Nakashima, S., Nakamura, T., Yoshikawa, T., Kin, S., Kuriu, Y., Nakase, Y., Sakakura, C., Otsuji, E., Hagiwara, A., Yamagishi, H.: Experimental study on in situ tissue engineering of the bile duct in a canine model. European Society for Artificial Organs XXXII Congress (2005.10.5-8. Bologna)
- 中瀬有遠, 萩原明於, 金 修一, 中島 晋, 吉川徹二, 宮川公治, 福田賢一郎, 栗生宜明, 阪倉長平, 大辻英吾, 筏 義人, 中村達雄, 山岸久一: 平滑筋細胞を接種したコラーゲンスポンジを用いた消化管の再生. 第 105 回日本外科学会定期学術集会(2005.5.11-13. 名古屋)
- 中瀬有遠, 萩原明於, 金 修一, 中島 晋, 吉川徹二, 宮川公治, 栗生宜明, 福田賢一郎, 阪倉長平, 大辻英吾, 筏 義人, 中村達雄, 山岸久一: 自己平滑筋細胞を接種した collagen scaffold による消化管の再生. 第 30 回日本外科系連合学会学術集会(2005.6.24-25. 東京)
- Nakase, Y., Hagiwara, A., Nakamura, T., Kin, S., Ikada, Y., Yamagishi, H.: Small intestine regeneration with smooth muscle cell-seeded collagen scaffolds. American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference (2005.6.9-11. Washington, DC)
- 中瀬有遠, 萩原明於, 金 修一, 中島 晋, 吉川徹二, 宮川公治, 栗生宜明, 福田賢一郎, 阪倉長平, 大辻英吾, 筏 義人, 中村達雄, 山岸久一: 自己平滑筋細胞を接種した collagen scaffold による消化管の再生. 第 30 回日本外科系連合学会学術集会(2005.6.24-25. 東京)
- 中瀬有遠, 萩原明於, 中村達雄, 金 修一, 中島 晋, 吉川徹二, 阪倉長平, 大辻英吾, 筏 義人, 山岸久一: 自己平滑筋細胞を接種した collagen scaffold による小腸の再生. 第 26 回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)
- 中瀬有遠, 萩原明於, 中島 晋, 吉川徹二, 宮川公治, 金 修一, 栗生宜明, 阪倉長平, 大辻英吾, 中村達雄, 筏 義人, 山岸久一: 自己平滑筋細胞を接種した collagen scaffold による消化管の再生. 第 60 回日本消化器外

科学会(2005.7.21. 東京)

Nakase, Y., Hagiwara, A., Nakamura, T., Kin, S., Nakashima, S., Ikada, Y., Yamagishi, H.: Using smooth muscle cell-seeded collagen scaffolds in tissue engineering of small intestine. European Society for Artificial Organs XXXII Congress (2005.10.5-8. Bologna)

Nakada, A., Fukuda, S., Kobayashi, T., Ueda, H., Tao, H., Nakamura, T.: De- and re-differentiation of the progenitor cells to the neurons. American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference (2005.6.9-11. Washington, DC)

福田正順, 中村達雄, 岸上義弘, 遠藤克昭: 大網を用いたイヌ脊髄損傷モデルの治療の試み. 第105回日本外科学会定期学術集会(2005.5.11-13. 名古屋)

Fukuda, S., Nakamura, T., Kishigami, Y., Azuma, T., Hayakawa, K., Endo, K., Tsutsumi, S.: Omental transposition therapy for spinal cord injury. American Society for Artificial Internal Organs, 51th Annual Conference (2005.6.9-11. Washington, DC)

福田正順, 中村達雄, 岸上義弘, 早川克己, 遠藤克昭, 市原理司, 藤川孝満, 東 高志, 堤 定美: 有茎大網弁によるイヌ脊髄損傷モデルの治療. 第26回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)

松野智宣, 橋本典也, 中村達雄, 呉本晃一, 佐藤田鶴子: SVVYGLR ペプチドが唾液腺細胞の再生に及ぼす影響. 第26回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)

松野智宣, 橋本典也, 中村達雄, 中原 貴, 佐藤田鶴子: 唾液腺再生へのプロセスペプチドがヒト唾液腺細胞細胞に及ぼす影響一. 第3回日本再生歯科医学会(2005.9.3. 東京)

Matsuno, T., Hashimoto, Y., Nakahara, T., Kuremoto, K., Nakamura, T., Satoh, T.: β -TCP/Collagen Sponge Composite Enhances the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. International Symposium of Maxillofacial & Oral Regenerative Biology in OKAYAMA 2005 (2005.9.18. Okayama)

Matsuno, T., Hashimoto, Y., Nakahara, T., Kuremoto, K., Nakamura, T., Satoh, T.: Effects of β -TCP/ collagen sponge composite on the osteogenesis differentiation of mesenchymal stem cells. The12th International Conference on Biomedical Engineering (2005.12.8. Singapore)

森野茂行, 鳥羽紀成, 永安 武, 高橋 充, 國崎真己, 松本桂太郎, 中村昭博, 田川 努, 東 高志, 堤 定美, 田尾裕之, 中村達雄: 塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)を用いた肺機能再生に関する検討. 第28回日本呼吸器内視鏡学会総会(2005.6.9-10. 東京)

森野茂行, 鳥羽紀成, 高橋 充, 永安 武, 橋爪 聡, 松本桂太郎, 櫛引俊宏, 田畑泰彦, 荒木政人, 田尾裕之, 中村達雄: 肺気腫に対する FGF-2 の経気道的投与による呼吸機能再生に関する検討. 第26回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)

森野茂行, 鳥羽紀成, 田尾裕之, 荒木政人, 永安 武, 高橋 充, 宮崎拓郎, 松本桂太郎, 山崎直哉, 中村昭博, 田川 努, 中村達雄: 肺気腫に対する Growth Factor を使用した呼吸機能再生. 日本胸部外科学会総会(2005.10.4-7. 岡山)

2) 講演会・シンポジウム

中村達雄: in situ Tissue Engineering とその臨床応用, 医工学フォーラムー2004 年度特別学術講演会ー(2005.2.23. 京都)

中村達雄, 早川克己, 茂野啓示, 稲田有史, 堀 義生: in situ Tissue Engineering と医用材料. 第26回日本炎症・

再生医学会(2005.7.12-13. 東京)

中村達雄, 萩原明於, 稲田有史, 金丸眞一, 糸井真一, 遠藤克昭, 茂野啓示, 吉谷 信, 中田 顕, 福田正順: in situ Tissue Engineering と末梢神経の再生医療の現状. 第 26 回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)

中村達雄, 稲田有史, 金丸眞一, 萩原明於, 遠藤克昭, 福田正順, 糸井真一, 市原理司, 早川克己, 茂野啓示, 小林丈士, 吉谷 信: 感覚器再生と組織工学. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会(2005.11.28-29. 京都)

中村達雄, 稲田有史, 茂野啓示, 早川克己, 堀 義生, 遠藤克昭, 福田正順, 田尾裕之, 荒木政人, 佐藤寿彦, 中田 顕, 上田寛樹, 糸井真一, 市原理司: 再生医療の臨床とバイオマテリアル. 第 27 回日本バイオマテリアル学会大会(2005.11.28-29. 京都)

中村達雄: 再生医学の臨床応用, 「城東区医師会学術講演会」(2005.12.20. 大阪)

附属再生実験動物施設

Labortory of Animal Experiments for Regeneration

施設長・教授 坂口 志文

Acting Head, Prof. Shimon Sakaguchi

【再生実験動物施設の現状について】

附属再生実験動物施設では、2005年11月30日現在、イヌ;157頭、ネコ;8匹、サル;5頭、ウサギ;78羽、ラット;90匹、マウス;約8000匹が実験動物として飼育され、実験に供されている。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を専任助教授1名・技術職員2名・非常勤職員19名で行っている。

当研究所で動物実験を行うにあたっては、生命倫理・動物福祉に十分の理解と配慮をして実施する事が大前提である。この原則を周知・徹底させるため、動物実験に従事する者は、動物実験に関する法規制・内規、動物実験実施にあたっての原則、実験動物の取り扱い方等についての所内講習を受講することが義務付けられている。南部総合研究実験棟・動物飼育室を利用する者は、これに加えて、SPF(Specific Pathogen Free)マウスの取り扱いについて講習を受けなければならない。動物実験を実施するには、動物実験計画書を当研究所の動物実験計画書審査委員会に提出し、厳格な審査を受け承認を得ることが必要である。

南部総合研究実験棟(2002年12月設置、再生医科学研究所、ウイルス研究所、医学部附属ゲノム医学センターの3部局による共同研究実験棟)マウス飼育室は稼働を開始してから2年が経過した。現在、SPFマウス飼育室・全16室中、再生研;11室、ウイルス研;4室、ゲノム医学センター;1室、を使用している。本マウス飼育棟ではSPFマウスのみが飼育され、動物実験が行われている。搬入できるマウスは、指定実験動物供給業者から購入可能なSPFマウス及び当施設等において体外受精・受精卵移植によるクリーンアップを受けSPF化されたマウスのみに限定されている。また、飼育室に持ち込む生物試料(細胞・血清等)も、事前に当施設による検疫を受けることが義務付けられた。これらの厳格な管理の下、現在までのところ、感染事故等の深刻な問題は起きていない。ただ、共同実験棟マウス飼育室においては、SPFマウスの微生物汚染を防止するためには、動物飼育員、利用者各人の十分な注意が必要であるが、多数の人間が出入りする以上、いつ何時汚染事故が生じるかもしれない。不幸にして、幾つかの他校動物実験施設で微生物汚染事故が発生したことが報告されている。それらの苦い経験から、SPFマウスの微生物汚染の発生原因、汚染拡大様式、汚染除去法などを十分に学び、万一汚染が生じた時のことも想定し、汚染を最小限度に封じ込める等の対策について、本動物施設でも予め具体的な方策を立てておくことが必要であろう。一方、稼働し始めて明らかとなってきた設計、建築、設備上の種々の問題点、すなわち、室温・風量制御、凍結防止対策の不備等も徐々に把握されつつあり、対応可能になってきた。また、施設運営に関しても、3部局共同の建物であるため、当初、運営・予算の執行における困難さが指摘されてきたが、試行錯誤ながらも克服されつつある。ただ、独立法人化後の運営交付金の削減により、安定した施設運営が困難になりつつあり、この様な恒常的施設運営のための別枠の予算措置が講じられることを期待するものである。

東館動物施設は、副施設長による管理のもと、時代の要請に適合した飼育施設に変貌しつつある。すなわち、指紋認証制による利用者登録の導入、サル飼育室の改良、遺伝子改変動物飼育に適合したマウス・ラット室の改造等である。また、イヌについても、飼育数と出入の厳密な把握により、スムーズな登録と狂犬病予防注射が可能に

なった。しかしながら、施設・備品の老朽化が進行しつつあり、問題発生時に、まさに自転車操業的に対応しているのが現状である。また、毎年度予算的にも逼迫しており、このような対応がいつまで続けられるか予測不能である。今後は、南部棟動物施設と同様の受益者負担システムのさらなる導入と将来の大規模な改装を念頭においた施設運営が望まれる。

【研究概要】

再生実験動物施設は、再生医科学研究所の附属施設として、研究実施に不可欠である動物実験に関する全般的な管理業務(再生研の動物実験計画書の審査に関係する業務、動物実験に関する講習会の開催、再生研における実験動物の維持、管理など)と共に、一研究分野として以下の研究活動を行っている。

研究テーマ 1. GPI アンカー型蛋白質の代謝メカニズムと受精

現在の当研究室のメインテーマは、膜結合蛋白質の一種であるグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型蛋白質の代謝メカニズムの解明とその生殖細胞系列での生物学的意義の探究である。このため、まず、個体内での GPI アンカー型蛋白質の局在を網羅的に解析するために、GPI アンカー型 GFP レポーター蛋白質 (EGFP-GPI) を構築した。これを導入したトランスジェニックマウスでは、予想以上に EGFP-GPI が、外分泌腺や精巣において遊離していることを見出した (Kondoh G. et al. FEBS lett. 458, 299-303, 1999)。以後、この現象に特に着目し、マウス精巣生殖細胞より GPI アンカー型蛋白質遊離因子の精製・構造解析を行った。その結果、この因子のひとつとしてアンギオテンシン変換酵素 (ACE) を単離した。すなわち、この酵素には、アンギオテンシン I やブラディキニンなどの昇圧ペプチドの活性を制御するのみならず、多くの GPI アンカー型蛋白質を細胞膜より遊離する新たな活性を持つことが明らかとなった。また、今回同定した活性は、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼとして、これらのペプチドを分解するための活性中心とは別の部位に位置し、また、GPI アンカー型蛋白質のペプチド部分ではなく、GPI アンカーそのものを切断することも突き止めた。一方、ACE ノックアウトマウスでは、精子透明体結合不全による雄性不妊が知られている。そこで、このマウスの精子をペプチダーゼ不活性型 ACE で処理したところ受精能が回復した (図参照)。このことから、ACE は *in vivo* で GPI アンカー型蛋白質遊離活性があり、この活性をもって受精に重要な役割を担っていることが示唆された。今後は、これらの知見をもとに、

1. ACE の新規活性を担う機能ドメイン・活性中心の同定。
2. ペプチダーゼ活性欠損型 ACE 導入トランスジェニックマウスの作製による GPI アンカー切断活性の生物学的意義の検討。
3. 精巣型 ACE の糖鎖修飾と受精への関与の検討。
4. 生殖細胞における ACE 基質の検索と受精担当分子の同定。

などを研究課題として取り組んで行きたい。

研究テーマ 2. 遺伝子改変マウス作製技術の簡易化

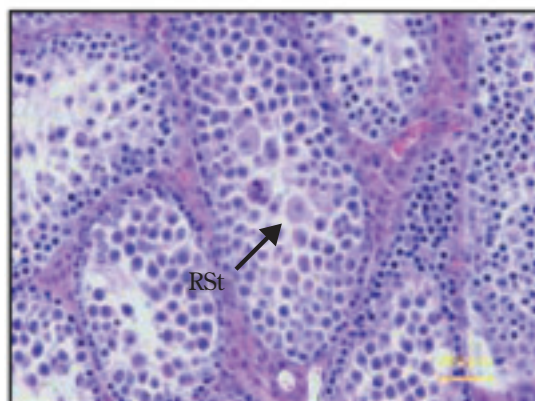
遺伝子改変マウスの作製には、何段階ものプロセスが存在し、多くの時間・労力・経費を必要とする。なかでも特に問題になるのが、ターゲティングベクターの作製、ES 細胞の培養そしてキメラマウス作製の段階であろう。我々は、これらのステップにおける“時間と労力のかからない技術の採用や改良”を心掛けてきた。ターゲティングベクターの作製においては、BAC クローンに基づく大腸菌内組み換えシステム (リコンビネーリング) を採用し、

従来に比べて四分の一の時間短縮に成功した。また、キメラマウスの作製においては、凝集法を改良し、高価なインジェクション機器の購入や煩雑なメンテナンスのいらない方法を可能にした(Kondoh G. et al. J. Biochem. Biophys. Methods., 39, 137-142, 1999)。これらの技術発展をもとに、現在までに幾多の遺伝子改変マウスの作製に参加している。

The angiotensin-converting enzyme (ACE) is a key regulator of blood pressure. It is known to cleave small peptides, such as angiotensin I and bradykinin and changes their biological activities, leading to up-regulation of blood pressure. Here we describe a novel activity for ACE: a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein releasing activity (GPIase activity). Unlike its peptidase activity, GPIase activity is weakly inhibited by the tight binding ACE inhibitor and not inactivated by substitutions of core amino acid residues for the peptidase activity, suggesting that the active site elements for GPIase differ from those for peptidase activity. ACE shed various GPI-anchored proteins from the cell surface, and the process was accelerated by the lipid raft disruptor filipin. The released products carried portions of the GPI-anchor, indicating cleavage within the GPI moiety.

Further analysis by HPLC/mass spectrometry predicted the cleavage site at the mannose-mannose linkage. GPI-anchored proteins such as TESP5 and PH-20 were released from the sperm membrane of wild-type mice but not in *Ace* knockout sperm *in vivo*. Moreover, peptidase-inactivated E414D mutant ACE and also PI-PLC rescued the egg binding deficiency of *Ace* knockout sperms, implying that ACE plays a crucial role in fertilization via this novel activity.

(文責 近藤 玄)



ペプチダーゼ変異型 ACE 導入トランスジェニックマウスでみられた精子形成異常。トランスジェニックマウスの精巣(Tg)のサイズはコントロールの約 50% で、円形精子細胞(RSt)の段階で分化が停止し、精子変態が障害されていると考えられた。

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Kondoh G., Tojo H., Nakatani Y., Komazawa N., Murata C., Yamagata K., Maeda Y., Kinoshita T., Okabe M., Taguchi R. and Takeda J. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nature Med.*, 11, 160-166 (2005).

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

近藤玄：アンギオテンシン変換酵素(ACE)による GPI アンカー型蛋白質遊離と受精への関与. ワークショップ「受精の分子生物学」 第 28 回日本分子生物学会年会 (2005.12.9. 福岡市)

2) 講演・シンポジウム

近藤玄：アンギオテンシン変換酵素(ACE)の新機能：GPI アンカー型蛋白質遊離と受精への関与. 講演会「受精機構の神秘を解く」 関西実験動物研究会第 86 回研究会 (2005.6.10. 吹田市)

近藤玄：受精メカニズムの解明. 京都大学再生医科学研究所平成 17 年度学術講演会 (2005.12.22. 京都市)

附属幹細胞医学研究センター Stem Cell Research Center

霊長類胚性幹細胞研究領域 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research

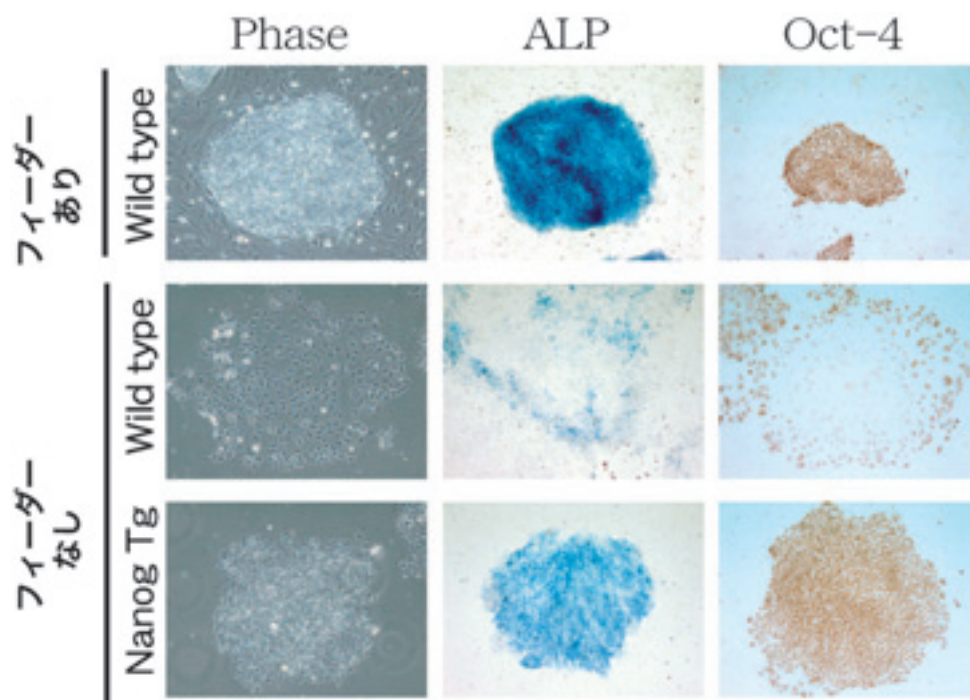
分野主任 助教授 末盛 博文

Assoc. Prof. Hirofumi Suemori

【研究概要】

霊長類胚性幹細胞研究領域ではヒト及び他の霊長類 ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。ヒト ES 細胞株の樹立とその分配は本研究領域の最も重要な役割である。ヒト ES 細胞は再生医療の発展に大きく寄与するものと考えられ、国内で樹立された細胞株の供給体制の確立が望まれてきた。我々はヒト ES 細胞株樹立研究計画の政府承認を得て、インフォームドコンセントに基づいて凍結胚の提供を受け平成 15 年初頭よりヒト ES 細胞株樹立を行い、これまでに提供を受けた凍結胚から 3 株の ES 細胞株を樹立した。これらのヒト ES 細胞株はそれぞれ KhES-1,2,3 と名付けられた。これらの細胞株は一年以上の継代維持の間その性質を安定に維持し、また正常な核型を保持していた。我々が樹立した細胞株は 2004 年 3 月から分配が開始されこれまでに 20 件以上の研究計画に対して細胞株が分配されている。

また、我々は ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究として、霊長類 ES 細胞の多能性維持機構、自己複製能に



図：霊長類 ES 細胞における Nanog の機能

Nanog 強制発現株(Nanog Tg)をフィーダー細胞非存在下で培養し、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色及び Oct-4 免疫染色を行った。対照の野生型細胞(Wild type)では細胞は未分化状態を維持できず ALP 活性、Oct-4 発現とも消失したが、Nanog 強制発現株はフィーダー細胞非存在下でも未分化 ES 細胞と似た形態を示し ALP と Oct-4 の発現も維持していた。このことから Nanog の発現維持によりフィーダー細胞非存在下で ES 細胞が未分化状態を保持できることがわかる。

関する研究を行っている。ES細胞の未分化性維持機構の研究はこれまで主にマウスES細胞を用いてなされてきたが、これまでに我々が示してきたようにマウスと霊長類ではさまざまな相違があることが分かってきている。そこで霊長類ES細胞を用いた研究が重要である。ホメオドメインを持つ転写因子NanogはマウスES細胞の未分化性維持に必須であり、発現維持することでフィーダー細胞非依存的に未分化性を維持することが報告されている。そこで、我々は霊長類ES細胞でのNanogの機能解析を行った。Nanogは霊長類ES細胞でも未分化特異的に発現しており細胞分化に伴いその発現は消失した。Nanogを恒常的に高発現する細胞株を作製したところ、Nanog高発現株はフィーダー細胞非存在下でも形態的に未分化状態を維持していた。また、Nanog高発現株で胚葉体作製により分化を誘導したところ、野生株では三胚葉および胚体外組織の分化が認められたのに対し、Nanog高発現株では内胚葉、栄養外胚葉の分化マーカーの発現が抑制されていた。これらの結果からNanog遺伝子は霊長類ES細胞においてもその未分化性維持に重要な機能を果たしていることを示した。このほか、ES細胞の遺伝子操作技術の開発研究などの将来の医療応用において不可欠の開発研究を進めている。

Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Stem Cell Research Center.

Embryonic stem (ES) cell lines are pluripotent stem cell lines which can be propagated indefinitely in culture retaining their differentiation potency into every cell types of tissues in the body. Since establishment of human ES cell lines were reported, clinical use of functional tissues and cells from human ES cells are expected. In Japan, there have been many demands for use of human ES cells on basic and pre-clinical researches. We started to establish human ES cell lines using donated frozen embryos in January 2003 and successfully established three human ES cell lines, KhES-1,2,3 so far. These cell lines have been distributed to more than 20 researchers who have governmental permission to use human ES cells for research purposes.

We are studying on molecular mechanisms for maintenance of pluripotency and self-renewal of primate ES cells. Nanog, a homeodomain transcription factor, was shown to be an essential factor in sustaining the pluripotency of mouse ES cells. However, it is unclear whether Nanog plays a role in maintaining pluripotency in primate ES cells. To elucidate functions of Nanog on primate ES cells, we carried out overexpression and knockdown experiments of the nanog gene in monkey ES cells. Results indicated that Nanog is involved in maintenance of self-renewal of monkey ES cells.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Kouichi Hasegawa, Shinichiro Chuma, Takashi Tada, Takayuki Sakurai, Masaru Tamura, Hirofumi Suemori and Norio Nakatsuji Testatin transgenic and knockout mice exhibit normal sex-differentiation. Biochemical and Biophysical Research Communication, in press.

Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, Akatsuka A, Yoshizaki T, Ishii H, Tanioka Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Sugawara A, Tamaoki N, Izawa K, Nakazaki Y, Hamada H, Suemori H, Asano S, Nakatsuji N, Okano H, Tani K. Establishment of Novel Embryonic Stem Cell Lines Derived from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). Stem Cells. 2005.

Ishii T, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Baba S, Naito M, Machimoto T, Kamo N, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I. In vi-

tro differentiation and maturation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Exp Cell Res.* 2005 Sep 10 ; 309 : 68-77 (2005).

Hatano SY, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech. Dev.*,122, 67-79, (2005).

Yasushi Takagi, Jun Takahashi, Hidemoto Saiki, Asuka Morizane, Takuya Hayashi, Yo Kishi, Hitoshi Fukuda, Yo Okamoto, Masaomi Koyanagi, Makoto Ideguchi, Hideki Hayashi, Takayuki Imazato, Hiroshi Kawasaki, Hirofumi Suemori, Shigeki Omachi, Hidehiko Iida, Nobuyuki Itoh, Norio Nakatsuji, Yoshiki Sasai and Nobuo Hashimoto. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clinic. Invest.*, 115, 102-109, (2005).

Takao Kuroda, Masako Tada, Hiroshi Kubota, Hironobu Kimura, Shin-ya Hatano, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Takashi Tada. Octamer and Sox elements are required for transcriptional *cis*-regulation of *Nanog* gene expression. *Mol. Cel. Biol.*, 25, 2475-2485 (2005).

2) 著 書

Hirofumi Suemori, Yoshiki Sasai, Katsutsugu Umeda and Norio Nakatsuji. ES cell lines from the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). in “Embryonic Stem Cells, A Practical Approach” (Oxford University Press, NY, USA) in press.

3) 総 説

長谷川光一, 末盛博文, 中辻憲夫: ES細胞を用いた再生医療への展望. *実験医学* 23 ; 181-186 2005.

安田晋也, 末盛博文, 中辻憲夫: ヒト胚性幹細胞, *ティッシュエンジニアリング* 2005 ; 18-24

安田晋也, 末盛博文, 中辻憲夫: ES細胞(胚性幹細胞), *産婦人科の世界*, 57 ; 597-605, 2005.

末盛博文: ヒト ES細胞樹立の意義, *Organ Biology*, 12 ; 301-310, 2005

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

安田晋也, 恒吉法尋, 角智行, 長谷川光一, 多田高, 中辻憲夫, 末盛博文: 霊長類 ES細胞における Nanog の機能. 第28回日本分子生物学会年会 12/8-12/10(福岡)

安達啓子, 川瀬栄八郎, 中辻憲夫, 末盛博文:

霊長類 ES細胞における遺伝子発現制御系の構築. 第28回日本分子生物学会年会 12/8-12/10(福岡)

佐藤秀樹, 三浦 傑, 山口歌奈子, 末盛博文, 中辻憲夫, 宮崎純一, 岩田博夫: Pdx1 遺伝子を導入したカニクイザル ES細胞からインスリン産生細胞への分化誘導. 第28回日本分子生物学会年会 12/8-12/10(福岡)

藤岡 剛, 安近 健太郎, 中村幸夫, 中辻憲夫, 末盛博文: ガラス化法を用いた簡便で効率よい霊長類 ES細胞の凍結保存法の検討. 第28回日本分子生物学会年会 12/8-12/10(福岡)

Hirofumi Suemori, Kentaro Yasuchika, Kouichi Hasegawa, Tomoyuki Sumi, and Norio Nakatsuji. Establishment and characterization of new human ES cell lines. International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells. 11/15-11/18, Kyoto.

Shin-ya Yasuda, Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Kouichi Hasegawa, Takashi Tada, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori. Nanog maintains self-renewal of Primate ES cells in the absence of a feeder layer. International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells. 11/15-11/18, Kyoto.

Kouichi Hasegawa, Tsuyoshi Fujioka¹, Yukio Nakamura, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori. Human embryonic cell lines showing resistance against physical damage and high cloning efficiency. International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells. 11/15-11/18, Kyoto.

佐藤秀樹・末盛博文・岩田博夫：ヒト間葉系幹細胞の順化培養液を用いたカニクイザル ES 細胞の未分化維持培養。
第 4 回日本再生医療学会総会 3/1-3/2 大阪

2) 講演・シンポジウム

長谷川 光一，末盛 博文，中辻 憲夫：細胞ソースとしてのヒト ES 細胞株の樹立，第 44 回日本生体医工学会大会 シンポジウム「再生医療工学 ～その最前線とさらなるブレイクスルーのための提言」 4/25 (筑波)

末盛博文：ヒト ES 細胞，その医療応用に必要なこと，第 23 回日本ヒト細胞学会大会 市民公開シンポジウム「ヒトの臓器はどこまで再生できるか」 8/27 (筑波)

末盛博文：ヒト ES 細胞と再生医療，第 8 回日本組織工学会 シンポジウム「発生と再生の接点と展開」 9/1 (東京)

幹細胞分化制御研究領域 Laboratory of Stem Cell Differentiation

分野主任 助教授 山下 潤

Assoc. Prof. Jun K. Yamashita

【研究概要】

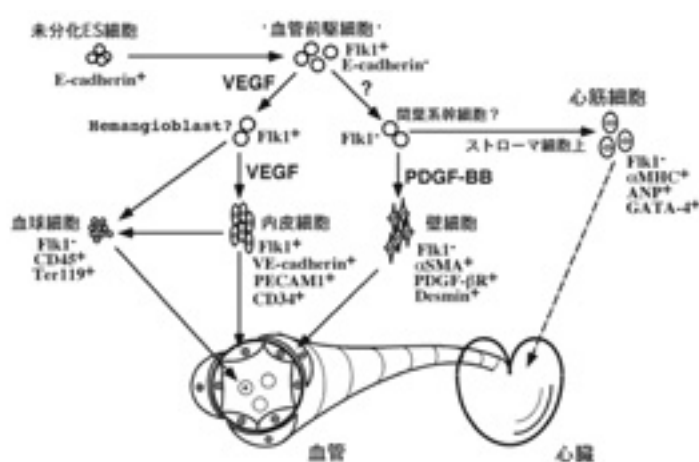
幹細胞分化制御研究領域では，ES 細胞(胚性幹細胞：embryonic stem cells)を用いて，心血管系の細胞分化・再生に関する研究を行っている。

ES 細胞は，全ての種類の細胞に分化することができるいわゆる「万能」幹細胞と考えられている。この全能性(pluripotency)を in vitro において引き出し，分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試みが様々な臓器，細胞をターゲットに行われている。我々は，ES 細胞を用いて中胚葉由来組織である血管および心臓の分化研究を行ってきた。

血管は，内腔を一層におおう内皮細胞とそれを外から取りまく壁細胞の 2 種類の細胞からなっている。その中を流れる血球細胞を含めてこれら血管構成細胞は互いに密接に連関しあい血管を形作る。VEGF の受容体の一つである Flk1 は血球・血管系細胞の最も早期の分化マーカーおよび中胚葉のマーカーと考えられている。我々は，ES 細胞を用いて in vitro において中胚葉，さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)を選択的に分化誘導し，最終的に血管としての高次構造を in vitro および in vivo において構築すること，いわば血管の発生過程を再現することに成功した(Yamashita J. et al. *Nature*, 2000.)。この in vitro 分化系で

は、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞が分化し、さらにそれらの細胞が血管としての高次構造を形成する。最近では、中胚葉由来の細胞の一つである心筋細胞も同様に Flk1 陽性細胞から分化誘導できることも明らかにしている。

(図)



このように我々の ES 細胞を用いた in vitro 分化系は、心血管および血球という循環器系の細胞群を系統的に分化誘導することができ、

心血管の発生分化過程を培養下に恣意的に操作しながらしかも経時的に観察できる。従って、この分化系を用いることにより心臓血管の発生分化のメカニズムを細胞レベル、分子レベルで検討し、ノックアウトマウスの形質解析に依存していた分化の分子機構の解析を in vitro で行うという新しいアプローチが可能になったと考えられた。

現在、この ES 細胞 in vitro 分化系を用いて、以下のようなプロジェクトを遂行及び予定している。

1. ES 細胞 in vitro 分化系を用いた血管細胞分化・多様化の分子機構の解析

- 1) DNA チップを用いた網羅的血管分化関連遺伝子の同定と RNA 干渉を用いた in vitro 遺伝子機能解析系の構築
- 2) 動静脈・リンパ管内皮特異的分化誘導と内皮細胞多様化機構の解析
- 3) 物理的刺激の血管内皮分化多様化における意義(Yamamoto K et al, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005)。

2. 誘導血管細胞の血管再生への応用

- 1) 移植におけるドナー細胞の最適な分化段階の決定

分化初期内皮細胞が特異的かつ有効に新生血管に寄与することを明らかにした(Yurugi-Kobayashi T et al, *Blood*, 2003)。

- 2) 移植細胞の遺伝子修飾による組織への動員、生着効率の改善効果の検討
- 3) 人工生体材料を用いた新しいハイブリッド人工血管の開発(Huang H et al, *J Artif Organ*, 2005)。

3. ES 細胞からの心筋細胞の分化誘導

- 1) 2 次元培養による新しい ES 細胞からの心筋細胞分化誘導法の開発(Yamashita JK et al, *FASEB J*, 2005)。
- 2) 心筋細胞 in vitro 分化系を用いた心筋分化・多様化の分子機構の解析
- 3) 新しい心臓再生治療への応用

4. 霊長類 ES 細胞からの心血管分化誘導

- 1) サル ES 細胞からの血管分化誘導

京都大学臨床病態医科学との共同研究により、サル ES 細胞からの血管分化誘導に成功した(Sone M. et al. *Circulation*, 2003)。

- 2) ヒト ES 細胞からの血管分化誘導

京都大学臨床病態医科学申請の輸入ヒト ES 細胞を用いた血管分化研究に参画し、日本最初のヒト ES 細胞分化研究を開始している。

- 3) ヒト ES 細胞からの心筋細胞分化誘導

ヒト ES 細胞使用計画「ヒト ES 細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」(研究代表者・山下 潤、

平成 17 年 3 月 10 日 文部科学大臣承認)

ヒト ES 細胞を用いた心血管分化研究を開始している。

Main theme of our research : Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular development and the application to cardiovascular regeneration using *in vitro* differentiation system of embryonic stem cells (and somatic cells).

Recently, we established a novel *in vitro* vascular differentiation system of ES cells (Yamashita et al. **Nature**, 2000). Using ES cell-derived Flk1 (VEGF receptor-2)-positive mesodermal cells as starting material, we can induce all of the vascular cellular compartments, that is, endothelial cells, mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) and blood cells. Vessel-like structures of endothelial cell tube with mural cell attachment and blood cell inside are formed from Flk1+ cell aggregates in 3-D culture. Thus, this *in vitro* system should reproduce the early process of vascular development. And we also demonstrated that the transplanted vascular cells induced by this system could contribute to developing vasculature *in vivo*. Moreover, we have succeeded in inducing cardiomyocytes from Flk1+ cells, indicating that all of cardiovascular cellular components could be induced in our *in vitro* differentiation system. (Fig. 1).

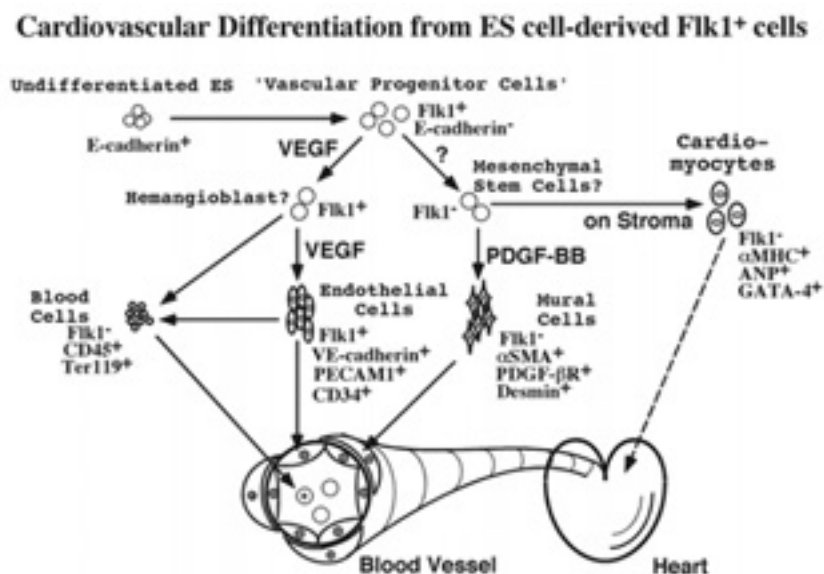


Fig. 1 : Cardiovascular development in ES cell *in vitro* differentiation system

In this system, we can manipulate the fate of cell differentiation, observe the behavior of differentiating cells, purify and obtain cells at various differentiation stages. This system provides us possibilities to dissect the mechanisms of cardiovascular development from new aspects, and offers novel potentials for cardiovascular regeneration.

Research Projects :

1. Elucidation of cellular and molecular mechanisms of vascular cell differentiation and specification using ES cell *in vitro* differentiation system.
- 1) Comprehensive molecular cloning of genes for endothelial cell differentiation by global gene expression profile

with DNA chip and a novel *in vitro* functional assay system using vector-based siRNA expression.

- 2) Specific induction of various endothelial cells types (i.e., arterial, venous, and lymphatic) and investigation of the mechanisms for endothelial specification.
 - 3) Significance of rheological force on endothelial differentiation and diversification (Yamamoto K et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005).
2. Application of induced vascular cells to vascular regeneration
- 1) Evaluation of appropriate differentiation stage of donor cells for cell transplantation.

We have demonstrated that Flk1+/VE-cadherin+ early endothelial cells specifically contribute to blood vessels as endothelial cells, specifically and efficiently, whereas Flk1+/VE-cadherin- vascular progenitor cells do not, using cell transplantation to mouse tumor angiogenesis model (Yurugi-Kobayashi T., et al. Blood, 2003).
 - 2) Improvement of the efficacy of recruitment, contribution, and survival of donor cells, by modifying gene expressions in donor cells.
 - 3) Development of novel hybrid vessels with ES cells and artificial scaffolds (Huang H et al, J Artif Organ, 2005).
3. Cardiomyocyte induction from ES cells
- 1) Establishment of a novel cardiomyocyte induction system in 2-dimensional culture (Yamashita JK et al, FASEB J, 2005).
 - 2) Dissection of cellular and molecular mechanisms of cardiomyocyte differentiation
 - 3) Application to cardiac regeneration
4. Cardiovascular differentiation using primates ES cells
- 1) Vascular cell differentiation from monkey ES cells

We have succeeded in vascular cell differentiation from monkey ES cells (Sone M. et al. Circulation, 2003) (collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine).
 - 2) Vascular cell differentiation from human ES cells

We have already started research for vascular development using imported human ES cells as collaboration with Department of Medicine and Clinical Sciences, Kyoto University Graduate School of Medicine. (The first approved human ES cell research in Japan.)
 - 3) Cardiomyocyte differentiation using human ES cells

Our human ES cell research project “Research for differentiation mechanisms of cardiovascular cell differentiation using human ES cells” has been approved by the Science Ministry of Japan (2005.3.10).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, Shimazu C, Yan P, Yanagi K, Nakano A, Inoue E, Kita F, Nishikawa SI.
Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a novel single cell-based cardiomyocyte induction.
FASEB J, 19 : 1534-1536, 2005.

Hisatsune H, Matsumura K, Ogawa M, Uemura A, Kondo N, Yamashita JK, Katsuda H, Nishikawa S, Chiba T,

- Nishikawa SI. A high level of endothelial cell-specific gene expression by a combination of 5' flanking region and 5' half of the first intron of VE-cadherin gene. **Blood**, 105 : 4657-4663, 2005.
- Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, Ohmura N, Matsushita A, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 288 : H1915-1924, 2005.
- Huang H, Nakayama Y, Qin K, Yamamoto K, Ando J, Yamashita J, Itoh H, Kanda K, Yaku H, Okamoto Y, Nemoto Y. Differentiation from embryonic stem cells to vascular wall cells under in vitro pulsatile flow loading. **J Artif Organ**, 8 : 110-118, 2005.
- Saito T, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Tanaka T, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Tojo K, Tajima N, Hosoya T, Nakao K. Angiotensin II suppresses growth arrest specific homeobox (Gax) expression via redox-sensitive mitogen-activated protein kinase (MAPK). **Regul Pept**, 127 : 159-167, 2005.
- Tanaka T, Fukunaga Y, Itoh H, Doi K, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Sawada N, Sakaguchi S, Arai H, Nakao K. Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration. **Eur J Pharmacol**, 508 : 255-265, 2005.

和文総説

- 山下 潤. 「血管発生のメカニズム」 人工臓器・再生医療の最先端, 許俊鋭・斎藤明・赤池敏宏編, p144-p149, 2005. 先端医療技術研究所
- 山下 潤. 「血管の発生と分化メカニズムー血管構成細胞分化多様化の視点からー」 実験医学, 23: 2425-2430, 2005. 羊土社
- 山下 潤. 「ES細胞を用いた心血管細胞分化誘導と心血管再生」 再生医療, 4: 47-53, 2005. 日本再生医療学会
- 山下 潤. 「血管の発生と分化」 治療学, 39: 9-14, 2005. ライフサイエンス出版
- 山下 潤. 「ES細胞に関する研究の進歩」 循環器専門医, 13: 10-16, 2005. 日本循環器学会
- 山下 潤. 「血管系の発生とその制御」 Molecular Medicine, 42: 618-626, 2005. 中山書店

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Yamashita JK.: Cellular and molecular mechanisms of vascular specification. 第2回心血管幹細胞研究会(2005.1.15. 東京)
- 山下 潤: ES細胞を用いた心血管分化再生研究-構成的発生生物学の試み-, 第2回再生医学研究会(2005.4.19. 三重)
- 山下 潤: ES細胞を用いた心血管分化再生研究. 循環器病研究会(2005.6.23. 佐賀)
- 蟹江(平岡)美奈, 山下 潤: テトラサイクリン誘導性 shRNA 発現 ES細胞を用いた細胞分化における in vitro 遺伝子機能解析システムの構築. 日本分子生物学会(2005.11.9. 福岡) (poster)
- 山下 潤: ES細胞を用いた心血管分化再生研究-構成的発生生物学の試み-, 再生医科学研究所学術講演会

(2005.12.23. 京都)

2) 講演・シンポジウム

山下 潤: ES細胞を用いた in vitro における心血管分化制御. 理研シンポジウム「ケミカルバイオロジーの新展開」
(2005.2.4. 東京)

Yamashita JK: Constructive reproduction of arterial-venous specification in vitro. Keystone Symposia “Molecular regulation of Stem Cells” (2005.2.10-15. Banff, Canada) (poster)

山下 潤: ES細胞を用いた動静脈リンパ管内皮分化機構の解析. 血管生物学シンポジウム(2005.2.28. 金沢)

山下 潤: ES細胞を用いた動静脈内皮分化機構の解析と動静脈選択的血管再生の可能性. 日本再生医療学会シンポジウム(2005.3.2. 大阪)

山下 潤: ES細胞を用いた動静脈リンパ管分化機構の解析. 日本血管細胞生物学会シンポジウム(2005.10.25. 仙台)

Yurugi-Kobayashi T, Schroeder T, Nagasawa T, Nakao K, Nishikawa SI, Yamashita JK: Constructive induction of arterial and venous endothelial cells from embryonic stem cells. International symposium on Germ cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells. (2005.11.15-18. Kyoto, Japan) (poster)

山下 潤: ES細胞を用いた構成的アプローチによる血管多様化機構の解析. 日本血栓止血学会シンポジウム(2005.11.24 福岡)

Yamashita JK: Human ES cell research in Japan. 2nd Franco-Japanese Bioethics Workshop. Approaching Bioethical Issues in Their Cultural Context. (2005.12.19. Osaka, Japan)

幹細胞加工研究領域 Laboratory of Stem Cell Engineering

分野主任 助教授 多田 高
Assoc. Prof. Takashi Tada

【研究概要】

体細胞はその世代を支えるために特殊化した細胞である。ゲノム再プログラム化とは、すでに運命づけられた体細胞のエピジェネティクスを変化させ、その記憶を未分化細胞様に変換する事により多能性を獲得する現象である(図1)。体細胞核移植クローン動物が成功例として知られるが、我々は世界に先駆け体細胞と胚性幹(ES; Embryonic Stem)細胞との細胞融合により体細胞核が再プログラム化され多能性を獲得することを発見した。我々は、1)ゲノム再プログラム化分子機構の解明、2)体細胞由来個人対応型(テラーメイド)幹細胞の作製をめざして鋭意研究を進めている。

ゲノム再プログラム化の分子機構 体細胞ゲノムとES細胞ゲノムを区別する目的で、マウス亜種間融合細胞を実験に用いている。亜種間融合細胞由来の分化細胞では再プログラム化体細胞ゲノムから組織特異的な遺伝子発現が

確認され、その分化方向や遺伝子発現は由来する体細胞の性質に非依存であることを明らかにした。また、体細胞核のゲノム再プログラム化に伴い、体細胞特有の堅いクロマチンがゲノム全体で変化し、未分化細胞では緩いクロマチンが形成されることをヒストンのメチル化修飾の解析から明らかにした。これらの結果から、ゲノム再プログラム化機構に関して、体細胞エピジェネティクスの消去と未分化細胞エピジェネティクスの確立の2段階説を提唱し、それぞれのプロセスに働く機構や因子の解析を行っている。

ゲノム再プログラム化と *Nanog* 遺伝子 未分化エピジェネティクスの確立に働く因子として、近年同定された *Nanog* 遺伝子の特性解析を行った。ホメオドメインをもつ転写因子である *Nanog* は未分化細胞に高い特異性をもって発現しており、細胞の未分化性維持においても、ゲノム再プログラム化においても必須の役割を果たす。*Nanog* の未分化細胞に特異的な発現は、転写開始点の上流約 200 bp に存在する Octamer/Sox 配列を介した他の未分化維持因子 *Oct4* や *Sox2* とのクロストークにより制御されることを発見した。未分化性維持分子ネットワークにおける *Nanog* の位置づけが明らかになった。

生殖細胞における *Nanog* 遺伝子 生殖細胞では劇的なエピジェネティクスの書き換えに伴いゲノムの若返り(再プログラム化)が起こる。この時期に *Nanog* の発現が見られていたが、その詳細は不明のままであった。我々が独自に作製した抗 NANOG 抗体を用いて生殖細胞の発生段階における NANOG 蛋白質の発現を解析した。NANOG は新生生殖細胞では発現が抑制されているが、移動・増殖期の生殖細胞で高発現し、生殖巣移入後に再抑制される。生殖細胞における NANOG の発現時期と体細胞記憶の消去時期が重なり、細胞増殖と再プログラム化の関連が示唆された。

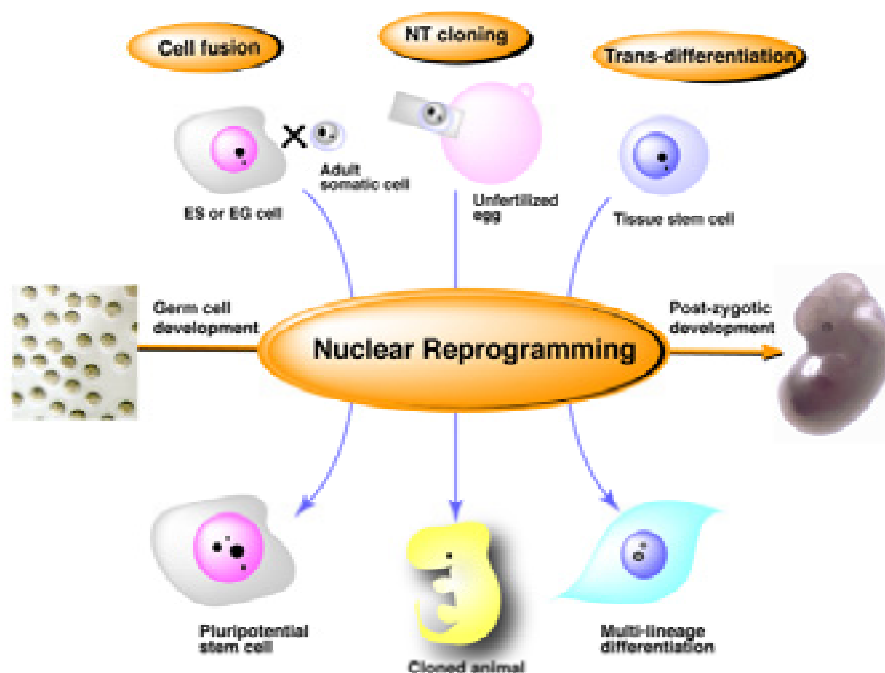


図 1. ゲノム再プログラム化 (Nuclear Reprogramming) の概要

Our body is built by an incredible variety of cell and tissue types, which develop from a single fertilized egg through embryogenesis. Those cells are basically classified into two types of cells; somatic cells and germ cells. Somatic cells function in forming and maintaining body parts only for the one generation, while germ cells including gametes and their precursor cells are diversified for transmitting genetic and epigenetic information to the next generation.

It has been shown that determination of cell fate is epigenetically regulated through activation or repression of specific genes. Nuclear reprogramming is a phenomenon that a specialized somatic cell acquires pluripotential competence, which is defined by multi-lineage differentiation, due to reset of epigenetic memory of the somatic cell. Recent development of a technology of embryo manipulations achieves epigenetic reprogramming by nuclear transplantation of a somatic cell to enucleated oocytes as seen by production of cloned animals in many species. We found that embryonic stem (ES) cells, which have the robust capability of self-renewal with pluripotency under culture conditions, retain the nuclear reprogramming activity as shown by cell hybridization with a somatic cell. Cell hybridization technology may, therefore, have potential to make an important contribution to personal therapeutic applications with no contribution of therapeutic cloning.

To evaluate the full potential of a reprogrammed somatic genome, we have generated inter-subspecific hybrid cells with *Mus musculus domesticus* ES cells and *M. m. molossinus* somatic cells or *vice versa*, in which frequent DNA sequence polymorphisms allow us to monitor the origin of gene expression. Consequently, it has been revealed that the reprogrammed somatic genome has gained nuclear competency for transcription of mRNAs specific to various types of tissues derived from the hybrid cells. Thus, it is likely that the reprogrammed somatic genomes function equivalent to the ES genomes in differentiated cells. In the next, to understand molecular mechanism of the nuclear reprogramming, changes of chromatin structure of somatic nuclei after cell hybridization with ES cells were analyzed by immunocytochemical and chromatin immunoprecipitation assays. We have demonstrated that the acquisition of pluripotential competence by a reprogrammed somatic genome is accompanied, independent of gene activity, by global de-condensation of the somatic cell-derived chromatin. This is most clearly marked by hyper-di-methylation at histone H3 lysine 4. We have proposed that this erasure of somatic cell-specific histone modifications is a crucial step in the induction of successful nuclear reprogramming. To acquire pluripotency on the reprogrammed somatic genome, pluripotential cell-specific genes function for establishment and maintenance of a pluripotential state-specific epigenotype.

Homeodomain-bearing transcriptional factor, *Nanog* is a newly identified pluripotential cell-specific genes. Our data clearly demonstrated that *Nanog* was essential for maintaining pluripotency of stem cells and inducing successful nuclear reprogramming of somatic nuclei through cell fusion and nuclear transplantation. *Nanog* expression was controlled by an adjacent pair of highly conserved Octamer- and Sox-binding sites at about 200 bp upstream of the transcriptional starting site. Other important stem cell factors, OCT4 and SOX2 were capable of binding to the Octamer and Sox elements, respectively, indicating that NANOG, OCT4 and SOX2 play a key role in maintaining pluripotency through their cross-talk in the molecular network of stem cells.

Nuclear reprogramming is progressing during germ cell development *in vivo*. No expression of NANOG protein was observed in early primordial germ cells (PGCs) identified by the expression of Stella/PGC7 in E7.25 embryos. NANOG became detectable in PGCs of E7.75-8.0 embryos and thereafter NANOG expression was maintained in migrating and proliferating PGCs. Timing of NANOG expression was well matched when drastic nuclear reprogramming occurred, implying that NANOG is directly or indirectly involved in the event of nuclear reprogramming in germ cells.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., Tada, T.: Octamer and Sox elements are required for transcriptional *cis*-regulation of *Nanog* gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 2475-2485 (2005)
- Hatano, S., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N., Tada, T.: Pluripotential competence of cells associated with *Nanog* activity. *Mech. Dev.* **122**: 67-79 (2005)
- Yamaguchi, S., Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N., Tada, T.: *Nanog* expression in mouse germ cell development. *MOD Gene Expr. Pat.* **5**, 639-646 (2005)

2) 著 書

- Tada, M., Tada, T.: Epigenetic reprogramming of somatic genomes by electrofusion with embryonic stem cells. In “Nuclear reprogramming ; Methods and Protocols” ed. Steve Pells (Humana Press, USA), pp67-79 (2005)
- Tada, M., Tada, T.: Nuclear Reprogramming of Somatic Nucleus hybridized with ES cells by electrofusion. In “Non-human Embryonic Stem Cell Protocols” ed. Kursad Turksen (Humana Press, USA), pp411-420 (2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., Tada, T.: Octamer and Sox elements are required for transcriptional *cis*-regulation of *Nanog* gene expression, Keystone Symposium -Molecular Regulation of Stem Cells- (2005.2.10-15. Banff, Canada)
- 山口新平, 木村博信, 多田政子, 中辻憲夫, 多田 高: 幹細胞特異的遺伝子 *Nanog* の生殖細胞系列での発現パターン: 日本発生生物学会第 38 回大会 (2005. 6. 1-4. 仙台)
- 三瀬名丹, 杉本道彦, 小早川智, 池 郁生, 多田 高, 小川穀彦, 金谷重彦, 野瀬俊明, 阿部訓也: マウス胚性幹細胞および始原生殖細胞の包括的遺伝子発現解析: 日本発生生物学会第 38 回大会 (2005. 6. 1-4. 仙台)
- 多田 高: ゲノム再プログラム化によるテラーメイド幹細胞の作製に向けて: 三重大学再生医学研究会 (2005.6.20. 津・三重)
- 多田 高: ゲノムリプログラミングにおける体細胞核のダイナミクス: 第 2 回細胞核ダイナミクス班会議 (2005.11.7-9)
- Matsumura, H., Tada, M., Otsuji, T., Yasuchika, K., Tada, T.: Selective chromosome elimination from ES-somatic hybrid cell nuclei after nuclear reprogramming: International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (2005.11.15-18. Kyoto)
- Yasuda, S., Tsuneyoshi, N., Sumi, T., Hasegawa, K., Tada, T., Nakatsuji, N., Suemori, H.: *Nanog* maintains self-renewal of Primate ES cells in the absence of a feeder layer: International Symposium on Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells (2005.11.15-18. Kyoto)

安田晋也, 恒吉法尋, 角 智行, 長谷川光一, 多田 高, 中辻憲夫, 末盛博文: 霊長類 ES 細胞における Nanog の機能: 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.7-10. 福岡)

三瀬名丹, 洲上拓也, 杉本道彦, 小早川 智, 杠 美佐子, 池 郁生, 多田 高, 小川毅彦, 金谷重彦, 野瀬俊明, 阿部訓也: 自己組織化マッピング法による胚性幹細胞・生殖細胞の発現相互解析: 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.7-10. 福岡)

木村博信, 黒田貴雄, 多田政子, 多田高: 未分化性維持因子 NANOG のポストトランスレショナル修飾と機能: 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.7-10. 福岡)

松村寛之, 多田政子, 尾辻智美, 安近 健太郎, 多田 高: ES-体細胞融合細胞核からの染色体除去技術の開発: 第 28 回日本分子生物学会年会(2005.12.7-10. 福岡)

2) 講演・シンポジウム

多田 高: ゲノム再プログラム化の分子機構と再生医療応用: 先端医療振興事業団講演会(2005.1.25. 神戸)

T. Tada, M. Tada (2005) Molecular mechanisms of epigenetic reprogramming of somatic nuclei: Genetics Seminar in British Columbia University (2005. 2. 17. Vancouver, Canada)

多田 高: ES 細胞との細胞融合による体細胞核の初期化機構: 特定領域公開シンポジウム「幹細胞の可塑性と未分化維持機構」(2005.2.24. 東京)

多田 高: ゲノム再プログラム化によるテラーメイド幹細胞の移植治療と創薬応用の可能性, 若手が拓く新しい薬剤学—細胞の新たな可能性からみる薬剤開発: 第 125 回日本薬学会総会シンポジウム(2005.3.29-31. 東京)

T. Tada (2005) Toti-/pluripotent stem cells and epigenetics: Spring School Meeting of Regenerative Medicine “Differentiation of neuronal progenitor cells” (2005.5.30-6.4. Rostock, GERMANY)

山口新平, 黒田貴雄, 多田政子, 木村博信, 中辻憲夫, 多田 高: 未分化維持因子 *Nanog* の生殖細胞での発現と転写調節機構, 幹細胞生物学の展開: 第 38 回発生生物学会シンポジウム(2005.6.1-4. 仙台)

多田 高: ゲノム再プログラム化とエピジェネティクス, 分化全能性—普遍性と特異性—: 国際高等研究所シンポジウム(2005.6.25. 精華町・京都)

多田 高: ゲノム再プログラム化の分子基盤と再生医療応用: Human Life Science Forum(2005.10.21. 大阪)

T. Tada (2005) Molecular mechanisms of nuclear reprogramming: International meeting of Mammalian Oogenesis and Epigenetic Modification (2005.10.22-23. Chiba, JAPAN)

多田 高: Selective Chromosome Elimination from Pluripotent ES-Somatic Hybrid Cell Nuclei, Pluripotency and plasticity of stem cells: 第 28 回日本分子生物学会シンポジウム(2005.12.7-10. 福岡)



細胞プロセッシング研究領域 Laboratory of Cell Processing

客員教授 高橋 恒夫

Visiting Prof. Tsuneo A. Takahashi

【研究概要】

細胞プロセッシング研究領域は、ヒト ES 細胞の臨床応用を目指しその基盤技術の研究開発を行うべく、2005 年度に新設された部門である。

2005 年度は、ES 棟内地下に医薬品 GMP ハードに準拠したヒト ES 細胞専用の細胞処理・保存施設 (cell processing center) の設計設置を行った。研究領域としての本格的な活動は、施設の完成及び機器類の設置稼動する 2006 年度以降となる見込みである。今後、霊長類胚性幹細胞研究領域と共同で、臨床レベルで使用するためのヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる取扱基準規格を構築すると共に、臨床応用に使用可能なレベルのヒト ES 細胞由来の細胞リソースの臨床研究施設への提供と、将来のヒト ES 細胞バンクの可能性の探索を目指す。

The new Laboratory of Cell Processing was established in the fall of 2005 to develop basic technologies to produce and supply clinical grade human embryonic stem cells (hES cells). This cell processing center specializes in Good Manufacturing Practices (GMP) in processing and preservation of the clinical grade hES cells for medical products. The facility will be constructed in the basement of the Stem Cell Research Center and will start operation by 2006 when all the equipments are installed. The standards and standard operation procedures (SOPs) to produce clinical grade hES cells will be prepared in collaboration with the Laboratories of the Embryonic Stem Cell Research. The Laboratory plans to start supplying clinical grade hES cells to researchers as a hES cell resource bank in several years.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

総説

末盛博文, 高田 圭, 細胞バンク・ヒト ES 細胞: 分子細胞治療 in Press

附属ナノ再生医工学研究センター Research Center for Nano Medical Engineering

ナノバイオプロセス研究領域 Department of Nano Bioprocess

分野主任 教授 楠見 明弘

Prof. Akihiro Kusumi

【研究概要】

1. 生きている細胞中での1分子観察と操作法の開発

世界的には、in vitro での1分子観察と操作ができる研究室は増えてきている。しかし、私達の研究室の特徴は、1分子観察と操作を生細胞中でおこなうことで、それによって、1分子細胞生物学が可能になった。具体的には生きている細胞中の1分子を、マイクロ秒レベルの時間分解能、ナノメートルレベルの空間精度で追跡し、さらに、それらの分子の活性化(反応)までも1分子毎に見る方法を開発してきた(これらは世界でも我々のみ)。これは、ナノサイエンス/ナノテクノロジーとの融合領域として、1分子ナノバイオロジー、1分子細胞生物学という新しい学問分野の創造につながりつつある。

なお、以下の発見は、1分子法を使って初めて可能になったものであり、単なる生細胞中でのイメージングや多数分子の計測では不可能であったものばかりである。

2. 細胞膜の基本的な構造と、働き方について

細胞膜は2次元の液体(連続体)と考えられてきた。しかし、私達は、(1)細胞膜はコンパートメント化されていること、(2)これは細胞膜に取り込まれた全ての分子に対して働くこと、(3)その機構は、基本的にはアクチン膜骨格によるもので、膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質が拡散障壁として働くこと、などを示した。これは、シンガー-ニコルソンモデルに重要な変更を迫るものであり、膜の構造と働き方について、基本的なパラダイムシフトを起こした研究である。

例えば、受容体はシグナルを受けた後、会合して運動を停止するものが多いが(シグナルが来た位置を数十秒程度記憶する)、これは、会合体が膜骨格によるコンパートメントに閉じ込められるか、膜骨格に結合することによってことがわかった。さらに、神経細胞の細胞膜には脂質をも通さない拡散障壁が生じるが、これも、アクチン膜骨格とここに結合する膜貫通型タンパク質が密に集合することによって出来ることを示した。

3. シグナル伝達の基本的な仕組みについて

シグナル伝達は、多くの場合、シグナル分子のランダムな拡散運動と衝突によって担われると考えられてきた。近年の、多くの足場タンパク質の発見は、これとは全く逆に、上流と下流の分子は、足場タンパク質が関与する場合にはずっと結合しているものであり、シグナルが来たら、固体の電気回路のように、シグナルを伝えるものであると考えられるようになった。しかし、私達は、ある分子が活性化されると、それに結合する足場タンパク質、下流分子などが急速に集まって信号複合体を形成すること、それらの多くは安定ではなく1秒以下の寿命で分解(不活化)する、ことを見いだした(Ras-Rafの系、ラフトの関与する系)。すなわち、1回毎のシグナル伝達は量子化されており、多数分子の平均として観察される生化学やイメージングによるシグナル変化は、これらの量子的なパル

ス状のシグナルの和であり、それを担うのがこれらの短寿命シグナル複合体であることが示された。これは、シグナル系のシステムとしての働き方を理解するためには、極めて重要な知見で、きわめて動的なシグナル分子の組織化によるシステム動作の一端が見えてきたと言える。

細胞外からシグナルが来ると、多数の細胞内分子が、急速に、協同的に、シグナル複合体を作ることがわかった。さらに興味深いことに、この複合体は、1秒以内に分解される。(図1)つまり、細胞のシグナルはパルス的で、デジタル式のシグナリングをやっているようだ。このような発見は、普通の多数分子観察では不可能であり、1分子観察の独壇場である。(図2)さらに、細胞膜の構造とその働き方に関して、パラダイムシフトを要求する発見ができた。細胞膜はコンパートメント化されており、そのために、例えば、シグナル複合体が形成されると、そこでシグナルの閉じ込めが起こることが分かってきた。

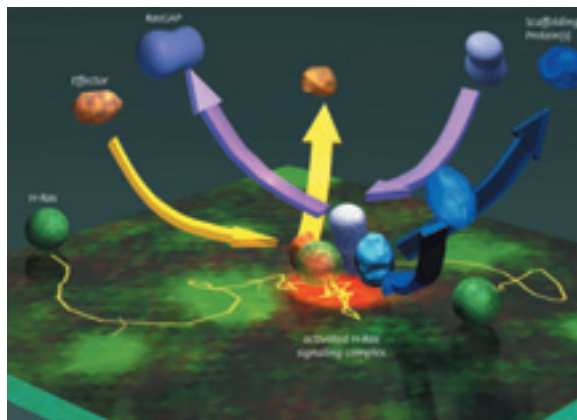


図1

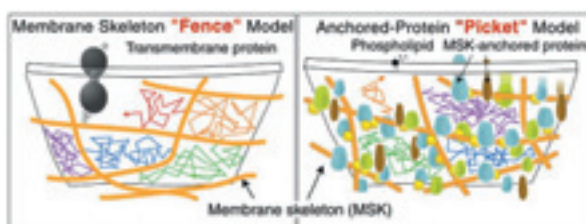


図2

[Summary of Research]

Paradigm shift in the plasma membrane concept

The plasma membrane has been considered to be a two dimensional liquid, with their constituent molecules, membrane proteins and lipids, diffusing freely in the plasma membrane, which is the Singer-Nicolson model widely accepted for these 30 years. However, we found that the plasma membrane is partitioned into many small compartments, and both membrane lipids and proteins undergo short-term confined diffusion within a compartment, and long-term hop diffusion between the compartments. These membrane compartments are delimited by the membrane skeleton and the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton (see Figure 2 above. Fujiwara et al., 2002 ; Murase et al., 2004 ; Kusumi et al., 2005). This entails a paradigm shift for the concept of the plasma membrane, from the continuous 2-dimensional fluid to the compartmentalized, structured system. This could be found because we have developed high time resolution (25 microseconds) single-molecule tracking techniques (Fujiwara et al., 2002 ; Ritchie et al., 2005). If more than one molecule is observed at the same time, the single hop event would be masked by averaging over all the molecules under observations. Without high-time resolutions, the residency time within a compartment for 1 ms to 1 s could not be detected.

Single-molecule force microscope

An ultra-sensitive, single-molecule optical force scanning probe microscope was developed that uses a single membrane molecule as a probe. This microscope measures the interaction force between the membrane-molecule probe with the membrane skeleton mesh in live cells, and, by mapping the force, images of the membrane skeleton that interact with the membrane molecule were obtained (Ritchie et al., in preparation). A theoretical framework was developed to understand/predict the behavior of single membrane molecules being dragged by the optical trap (Ritchie et al. in

preparation).

Development of a detection method for transient interactions of two species of molecules in living cells

Two species of molecules were labelled in different colors, and a method to detect their colocalization at the level of single molecules was developed for the first time (Koyama et al., 2005).

Single-molecules FRET imaging of H-Ras activation in living cells

The activation of H-Ras, a GTP-binding protein involved in the signaling pathways for cell proliferation and reorganization of the cytoskeleton, was visualized at the level of individual molecules using a technique called single-molecule fluorescence resonance energy transfer (single-molecule FRET; Murakoshi et al., 2004; Kusumi and Murakoshi, 2005; see Figure 1 above). Activation of H-Ras takes place only temporarily (<2s), and is accompanied by transient immobilization, which is likely due to the transient formation of an activated-Ras signaling complex with scaffolding proteins.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- K. Ritchie, X.-Y. Shan, J. Kondo, K. Iwasawa, T. Fujiwara, and A. Kusumi.: Detection of non-Brownian diffusion in the cell membrane in single molecule tracking. *Biophys. J.* **88**: 2266-2277 (2005).
- I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, R. Iino, H. Murakoshi, R. S. Kasai, and A. Kusumi: Fluorescence imaging for monitoring the colocalization of two single molecules in living cells. *Biophys. J.* **88**: 2126-2136 (2005).
- K. Suzuki, K. Ritchie, E. Kajikawa, T. Fujiwara, and A. Kusumi: Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophys. J.* **88**: 3659-3680 (2005).
- W. K. Subczynski, A. Wisniewska, A. Kusumi, and R. N. McElhaney: Effects of pH-induced variations of the charge of the transmembrane α -helical peptide ac-k₂(la)₁₂k₂-amide on the organization and dynamics of the host dimyristoylphosphatidylcholine bilayer membrane. *Biochim. Biophys. Acta — Biomembranes* (2006) in press.

2) 総説

- A. Kusumi, H. Murakoshi, K. Murase, and T. Fujiwara: Single-molecule imaging of diffusion, recruitment, and activation of signaling molecules in living cells. In "Biophysical aspects of transmembrane signaling", Chapter 5, S. Damjanovich, Ed. Springer-Heidelberg pp. 123-152. (2005).
- A. Kusumi, H. Ike, C. Nakada, K. Murase and T. Fujiwara: Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. *Sem. Immunol.* **17**: 3-21 (2005).
- A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara.: Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**: 351-378 (2005).
- A. Kusumi, K. Suzuki, J. Kondo, N. Morone, and Y. Umemura. Protein-lipid interactions in the formation of raft micro-

domains in biological membranes. In “Protein-lipid interactions: from membrane domains to cellular networks”, Chapter 13, L. Tamm, Ed. Wiley pp. 307-336. (2005).

藤原敬宏, 楠見明弘: 「細胞膜上のリン脂質の拡散運動遅延メカニズム: アンカード膜タンパク質ピケットモデル」, 膜(MEMBRANE), 30: 97-97(2005)

村瀬琴乃, 楠見明弘: 「細胞分子の一分子観察と操作」リボソーム応用の新展開～人工細胞の開発に向けて～, 301-311. NTS(2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会での招待講演

楠見明弘: 生細胞中での 1 分子 GFP イメージングの展開, 「日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会」(2005.6.1. つくば)

A. Kusumi: Digital signal transduction? Investigations by single-molecule observations., 「第 58 回日本細胞生物学会大会」(2005.6.17. 大宮)

A. Kusumi: Digital-like signal transduction? Investigations by single-molecule observations. The 30th FEBS Congress-9th IUBMB Conference. Symposium C3 “Receptor Proteins and Membrane Organization” (2005.7.6. Budapest, Hungary)

A. Kusumi.: Digital signal transduction? Investigations by single-molecule observations. 15th IUPAB & 5th EBSA Biophysics Congress. Symposium11 “Membrane Microdomains” (2005.8.29. Montpellier, France)

A. Kusumi.: Single molecule imaging of raft-based signal transduction in living cells. Academy Colloquium “Lipids moving center stage”. Royal Dutch Academy of Arts and Sciences. (2005.10.7. Amsterdam, The Netherlands)

A. Kusumi. Single molecule dynamics for signal transduction in the cell membrane. Sonderforschungsbereich 628: Functional Membrane Proteomics (2005.10.8. Frankfurt am Main, Germany)

A. Kusumi. Single molecule imaging of raft-based transduction in living cells. Annual Dutch meeting on Molecular and Cellular Biophysics (2005.10.10. Lunteren, The Netherlands)

A. Kusumi. Single molecule imaging of GPCRs hopping membrane picket fences. Great Lakes GPCR Retreat 2005. (2005.10.22. Quebec, Canada)

A. Kusumi. Single-molecule imaging of signal transduction in the plasma membrane of living cells. The 2005 Conference of the French Cell Biology Society (SBCF) (2005.11.7. Paris, France)

A. Kusumi. Katzir Conference on “Molecular Perspectives on Protein Interactions”(2005.11.9. Eilat, Israel.)

A. Kusumi. Cellular signal transduction mechanism as studied by single-molecule nanobiotechnology. International Symposium on Molecular Nanotechnology (2005.11.16. Nara, Japan)

楠見明弘: 細胞膜の短寿命プラットフォーム形成によるシグナル変換: 1 分子追跡/1 分子操作による研究, 「第 51 回日本病理学会秋期特別総会」(2005.11.17. 東京)

楠見明弘: 「誘導された局所場が可能にするシグナル変換: 1 分子追跡による研究」, 日本生物物理学会第 43 回年会 (2005.11.23. 札幌)

鈴木健一: 信号伝達ラフトの一分子可視化解析, 「日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会」(2005.6.1. つくば)

Kenichi Suzuki: Mechanism for raft-based signal transduction as studied by single-molecule tracking, 「第 58 回日本

細胞生物学会大会」(2005.6.17. 大宮)

T. Fujiwara, N. Morone, H. Mizoguchi, E. Kajikawa, C. Ohshima, T. Kobayashi, J. H. Keen, and A. Kusumii : Regulation mechanism for the assembly of adaptor protein AP2 molecules in clathrin-coated pits as studied by single fluorescent molecule video imaging. The 49th Annual Meeting of Biophysical Society of the U. S. A., Platform C : SAS Lateral and Rotational Dynamics of Cell Surface Molecules (2005.2.13. Long Beach, U. S. A) (Upgraded from Poster Presentation).

藤原敬宏, 諸根信弘, 梶川絵里子, 小林剛, James Keen, 楠見明弘 : 1 分子蛍光法によるクラスリン被覆ピットアダプター分子 AP2 の集合過程の可視化解析, 「日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会」(2005.6.1. つくば)

T. Fujiwara, N. Morone, E. Kajikawa, J.H. Keen and A. Kusumi : Formation mechanisms of clathrin-coated pit as studied by recruitment of single AP2 molecules, 「第 58 回日本細胞生物学会大会」(2005.6.17. 大宮)

2) 公開シンポジウムなどでの招待講演

楠見明弘 : 1 分子で見る細胞膜のシグナル変換機構, 第 1 回総合画像研究支援 NPO ワークショップ「バイオサイエンスのためのビジュアルテクノロジー」(2005.2.19. 東京)

A.Kusumi : Digital Signal Transduction at the Cell Membrane as Revealed by Single-Molecule Imaging Analysis, MCB Seminars, Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University (2005.5.19. Cambridge, U.S.A)

楠見明弘 : 細胞膜の担うシグナル変換の 1 分子解析, 第 31 回慶応ニューロサイエンス研究会「脳・神経機能の画像化 一分子・細胞レベルから個体レベルまで」(2005.6.4. 東京)

楠見明弘 : ラフトを見る, 理化学研究所シンポジウム「ナノドメイン生物学ワークショップ 05 発展する新たな生命膜情報科学」(2005.6.9. 東京)

楠見明弘 : 1 分子ナノバイオロジーが明らかにする細胞膜のデジタル式信号変換機構, 平成 17 年度生理学研究所研究会「生体膜輸送分子複合体の分子構築と生理機能」(2005.7.20. 岡崎)

楠見明弘 : 細胞中の一分子を見る, 触る, 「名古屋大学高等研究院第一回スーパーレクチャー」(2005.9.8. 名古屋)

楠見明弘 : 1 分子イメージングで解くシグナル変換のラフト機構, 第 21 回形態科学シンポジウム「膜ドメインの機能—基礎から疾患研究まで—」(2005.9.17. 名古屋)

藤原敬宏 : 1 分子追跡による, 細胞膜のシグナル変換機構の研究, 「第 2 回インビトロジェン・シンポジウム」(2005.9.2. 湘南国際村)

シミュレーション医工学研究領域 Department of Medical Simulation Engineering

分野主任 教授 堤 定美

Prof. Sadami Tsutsumi

【研究概要】

本研究室では、生体組織と力学的に調和する生体材料や人工臓器の開発など生体機能の再生を目的とした診断・治療の支援を行うために、コンピュータ科学や材料工学の手法を用いて、以下のような基礎的ならびに応用的研究を行っている。

1. 生体組織の力学的適応変形に関するシミュレーション

生体組織の力学的特性の解明を基本として、特に骨のモデリングならびにリモデリング現象など生体組織の力学的合理性の適応変形過程などについて数値シミュレーションを行っている。その結果、等応力分布あるいは等歪エネルギー密度分布などの制約関数に従って、各種骨組織の形態が形成されていることが示唆され、この制約の下に、生体組織と力学的に調和する人工関節等のインプラントのデザインの創生を試みている。(新エネルギー・産業技術総合開発機構助成金および NITE との共同研究)(厚生労働省科学研究費補助金)

2. 人工歯根周囲における歯根膜の再生

現在の人工歯根は、天然歯根のように歯根膜を持たず、直接顎骨に固定させるので、咀嚼時の動的荷重が緩衝されず直接顎骨に伝わる。その結果、歯槽骨に過大な応力が発生して骨吸収が起こり、ゆるみが生じる危険性が高い。そこで、チタン製人工歯根をポリマーで被覆し、表面処理により細胞接着性タンパク質であるコラーゲンを固定化し、さらにその上に歯根膜細胞を培養し、歯根膜ならびにセメント質の再生を図っている。(文部科学省科学研究費補助金)

3. MR Elastography (MRE)による in vivo 弾性率データの計測、解析および検証

磁気共鳴弾性率計測法(MRE)は、MRI をベースとする新たな測定技術であり、これによる体内組織・器官の非侵襲性弾性率計測の手法を確立し、医療研究支援用の生体組織データベースを構築する。また触感デバイスを用いた人工現実感(VR)による VR モデルシステムを開発している。(情報学専攻との共同研究)

4. パラレルメカニズム咀嚼ロボット

歯科や外科領域での診断や手術では、人体構造の静的な位置情報だけでなく、動的な運動情報が予後を左右する。運動情報をコンピュータに取り込むためにパラレルメカニズムを採用した多関節アームを開発してきたが、さらに駆動系を組み込んだパラレルロボットを開発し、個々の患者の口腔内モデルを咀嚼中に計測した顎運動情報に基づいて運動させるシステムを開発した。

5. 歯冠修復用高強度・高靱性ガラスセラミック材料と加圧成型システムの開発

優れた生体適合性と従来の歯科用ポーセレンよりも3~4倍高い曲げ強度と破壊靱性値をもつDiopside系ガラスセラミック材料を開発し、900℃付近で加熱・加圧成型・結晶化するシステムなど加工性と審美性をも備えた新しい歯冠修復用材料を研究してきており、臨床試験の最中である。

6. 新しい生体材料としてのマグネシウム合金の開発

生体必須のミネラルであり、比強度がもっとも高い金属の一つであるマグネシウムは、体液中でアパタイトの沈着が速やかであり、新生骨との結合と転化に優れた特性を有することを見出し、生体材料とくに人工骨用材料としての応用を目指している。（京都府中小企業総合センターとの共同研究）

7. 人工関節軟骨・人工椎間板などの医療用ハイドロゲル

関節軟骨が持つ優れた力学的特性を具備した人工関節軟骨材を開発することにより、関節の病変部のみを置換し健全な軟骨下骨梁を残す新しい人工関節軟骨の開発を目指している。当研究室にて新しく開発した高強度・高弾性率ポリビニルアルコールハイドロゲルは人工関節軟骨・椎間板材料として有望である。（医学研究科整形外科学講座との共同研究）

8. 耐摩擦・摩耗特性に優れた人工関節用ポリエチレン

人工関節の摺動部に使用される超高分子量ポリエチレンの摩耗粉により発生する不良肉芽組織が骨吸収を惹起する異物反応が問題となっている。そこで、物理的な改良法により最終成形物に分子配向と結晶面配向を導入することにより、耐摩耗性の改良を試み、良好な結果が得られている。

9. 生体組織と材料の衝撃吸収特性など力学的物性の測定ならびに解析

衝撃解析シミュレーションや生体を模した頸部モデルによる追突実験から、鞭打ち損傷を解明し、安全で快適な自動車シートの開発を試みている。

10. ポリフェノールによる細胞増殖制御と生体組織の長期間保存

緑茶ポリフェノールが種々の動物細胞の増殖を制御でき、細胞に対する無毒性の睡眠剤であることを見いだした。また、冬眠覚醒後ほぼ100%の細胞が増殖を再開することを明らかにした。更に、ラットの臍島や大動脈が体温で数ヶ月間も保存でき、他のラットへの移植後に正常に数ヶ月間生存することも確認した。現在、ポリフェノールを用い他の組織、例えば、ブタ膝関節軟骨、モルモット歯根膜、及び家兎角膜等に対する長期間保存の検討も行い、良好な結果が得られた。（文部科学省科学研究費補助金）

11. 骨格筋収縮エネルギーを利用した人工心臓駆動システム（筋肉の力学モデルの構築）

患者自身の筋肉を駆動力に用いる「骨格筋ポンプ」と呼ばれる新しいデバイスの開発を目的としている。広背筋と胸膜の間にバルーンを挟み込み、広背筋に電気刺激を与えて収縮させ、その収縮力を人工心臓の駆動力として有効に利用する。（文部科学省リーディングプロジェクト）

12. 生体形態計測システムと手術シミュレーション（顎変形症治療計画支援システム）

顎変形症手術に際しては、患者と術者とが術式の定量的検討と術後の咬合機能と顔貌の改善予測情報を確認して（informed consent）、望むことが極めて重要である。3次元画像を多用した、治療計画支援のためのシステムを開発している。（医学研究科口腔外科学講座および整形外科学講座との共同研究）

13. 人体に優しい義歯床

現在、臨床で広く使用されている義歯床として、加熱重合タイプのポリメチルメタクリレート（PMMA）と、射出成型タイプのポリサルホン（PS）やポリカーボネート（PC）が知られている。加熱重合タイプのPMMAは、重合に伴う収縮率が高く、耐衝撃性等の力学的特性に劣る上、特に残留モノマーが多いため、使用時に残留モノマーの溶出によるアレルギー反応が惹起されることが指摘されており、生体に対する安全性の問題が残っている。

そのため、これに替わる材料としてPSやPCが射出成型用義歯床として使用されるようになって来た。ところがPSは耐衝撃性に劣り、またPCについても、残留モノマーであるビスフェノールが、近年環境ホルモンとしての毒性が大きく取り上げられている。さらにPMMA補修部材としての接着性が悪い為、人体にとって安全で、し

かも耐衝撃性等の力学的特性に優れ、残留モノマーが少ない義歯床が切望されてきた。

本研究では、残存モノマーが極めて少なく、刺激や毒性のない人体に優しいのみならず、耐衝撃性や高曲強度で、耐久性に優れた射出成型タイプの義歯床を開発し、臨床の場に提供する準備を行っている。(近畿経済産業局速攻型地域新生コンソーシアム研究開発事業)

1. Simulation of Biomechanical Adaptation Process of the Living Tissues.

Numerical simulations are carried out especially on the modeling and remodeling phenomena of the bones as the biomechanical adaptation. With constraint functions such as stress distribution or strain energy density distribution, it is indicated that the form of the bone has been modeled, and the design of artificial dental roots which dynamically harmonizes with the living tissue under this constraint has been tried. (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

2. Regeneration of the periodontal Membrane around Dental Implant Roots.

The present artificial dental root is fixed directly in the alveolar bone without having periodontal ligament like natural tooth root, the stresses are directly transmitted without any damping effect. The excessive stresses in the alveolar bone may arise and cause the bone resorption by which the loosening of the implants occurs. Therefore, we have been attempting that the dental implant made of titanium is covered with a polymer, and the collagen which is the cell adhesive protein is fixed by some surface treatments, and in addition, the periodontal ligament cell is cultivated on the surface for regeneration of the periodontal membrane. (Supported by Ministry of Culture, Science and Education)

3. MR Elastography Measurement, Analysis and Verification.

Magnetic resonance elastic modulus measurement method (MRE) of the elastic modulus is a new measuring technique based on the MRI, and it establishes the technique of the noninvasive elastic modulus measurement of the living tissue and organ in vivo. Database construction for the medical research support, and virtual reality (VR) system using the haptic device are investigated. (Joint Research with Information Division, Kyoto University)

4. Kinematic Analysis of a mastication Robot employing the 6-degree-of-freedom parallel mechanism

Dynamic behaviors of the human body affect the diagnosis or the prognosis of operations in dental and surgery fields. In our laboratory, mastication robot is developed in order to represent the human mandibular dynamics; i.e. not only kinematics but also pressure acting between jaws. The robot employs the 6-degree-of-freedom parallel mechanism in order to decrease the positional information errors.

5. Development of glass ceramics with high strength and toughness and pressure forming systems for restorative crown materials

Disilicate glass ceramics is known as biocompatibility. Moreover, we have been developing the ceramics to have 3 and 4-fold higher the strength and toughness than the used dental porcelains. The crystallization system with heating and pressure molding is developed and now is running a clinical trial.

6. Development of magnesium alloys as biomaterials.

Magnesium offers several advantages such as low density, high specific strength to weight ratio, good castability, non-toxic. Moreover, magnesium is an essential element in human body. The present study is carried out to evaluate magnesium in medical and dental applications and to examine its corrosion behavior. (A joint research with Kyoto Fuchu small enterprise and synthesis centers)

7. New Artificial Articular Cartilage and Intervertebral Disk.

Development of the artificial cartilage and intervertebral disk is necessary in order to recover support and mobility simultaneously in joints and spine which received the damage. We examined the possibility of the application of polyvinyl alcohol hydrogel which can control the mechanical strength by the change of water content and is excellent in the biocompatibility. It replaces only lesion part and leaves the sound subchondral bone. The high strength and high elastic modulus of the polyvinyl alcohol hydrogel newly developed in this department is promising as artificial articular cartilage and intervertebral disk material.

8. Polyethylene for Artificial Joints with High Wear Resistance.

The wear particles of polyethylene are produced by the friction between the metal and UHMWPE when artificial joint used for the long term. It is known that the osteolysis occurs by foreign body granulation tissue which the wear particle induces. The development of new UHMWPE for artificial joint which controlled super structure by the crystallization under molecular orientation is being tried in order to improve abrasion resistance of UHMWPE.

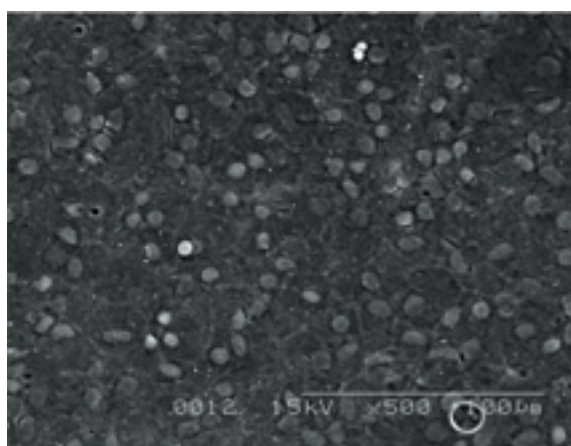
9. Measurement and Analysis of Impact Energy Absorption of the Living Tissues and Biomaterials.

By computer simulations and experiments with anatomical cervical model in rear-end collision, the generation mechanism of the whiplash injuries is clarified, and the development of the safe automobile sheet is being tried.

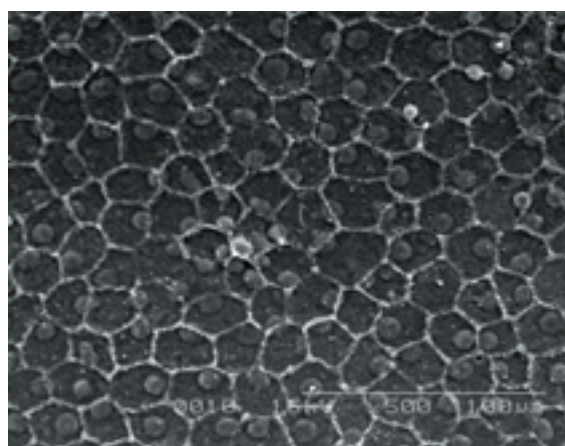
10. Proliferation Control of Mammalian Cells and Tissue Preservation for Long Term.

Ordinary method of cell and tissue storage is employed preserving method by freezing at extra low temperature of -196°C and original cell is gotten by rapid thawing of frozen cell as needs arises. However, the survival ratios cells after thawing and fusion is low, depending on a kind of cells and examiner's skill, while those of normal and useful cells such as Langerhans islets and liver cells except cancer cell is about 10 to 30%. We are investigating a novel preservation method, which can control the proliferation of various types of cells, and the long-term preservation of various tissue or organs at the physiological temperature using polyphenol as a preservation agent.

4°Cで2週間保存した後のヒト角膜内皮のSEM像



既存角膜保存液
(OPTISOL®-GS)



新規角膜保存液
(EGCg 200 μg/ml含有)

ヒト角膜を既存の角膜保存液中 4°C で 2 週間保存すると左図の様に角膜内皮細胞(六角形)が消失しているのに対して、新規に開発した角膜保存液では新鮮角膜と同様に角膜内皮細胞が正常に保たれている。

11. Mechanical Analysis of the isometric Contraction of the Skeletal Muscles for an Artificial Heart Support. (Construction of Dynamic Model of the Muscle)

Our development of a new device called “skeletal muscle pump” which uses the Latissimus Dorsi muscle for artificial heart drive system using the skeletal muscle contraction has been investigated. A balloon is inserted between the muscle and pleura, and an electric stimulation is given in the muscle to contract, and the shrinkage force is effectively utilized as driving force of the artificial heart. (Reading Project of The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Reading Project)

12. Morphometry System and Operation Simulation (Therapeutic Planning Support System for Jaw Deformities)

In the jaw deformation disease operation, patients and surgeons would like to confirm quantitative evaluation of operative method and improvement of postoperative occlusal function and feature (informed consent). The system for the therapeutic planning support which uses the three-dimensional images abundantly has been developed. (Joint Research with Department of the Oral Surgery and Orthopaedic Surgery Kyoto University)

13. The gentle denture base in human body

Today, we are researching and developing novel thermoelastic denture base composed of polymethylmethacrylate (PMMA) as a main component for injection molding. Denture base is generally employed polycarbonate (PC) as thermoelastic resin. However, PC is eluted in one's mouth, bis-phenol A of an environmental pollution, and furthermore, poor adhered to PMMA resin of repair adhesive. Heat-polymerized type PMMA mainly employed as denture base, is eluted in one's mouth a lot of monomer and oligomer, which come from residue product of polymerization, and is anxious to cause an allergy. We are researching and developing novel thermoelastic denture base which overcomes disadvantages of traditional denture resin.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Miwa, S., Yamazaki, K., Hyon, S-H., Komeda, M. : A novel method of ‘preparative’ myocardial protection using green tea polyphenol in oral uptake : Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery (3). 612-615 (2004)

Miyamoto, I., Tsuboi Y., Takahashi, K., Hyon, S-H., Iizuka, T : Enhancement of bone volume in guided bone augmentation by cell transplants derived from periosteum : an experimental study in rabbit calvarium bone. Clin Oral Implants Res. Jun ; 15 (3) : 308-14 (2004)

Kang, Y.-B., Tanaka, M., Tsutsumi, S. and Ikeuchi, K., The whiplash injury in rear-end collision using 3-D human whole body model, Proc. The 3rd IASTED International Conf. on BIOMEDICAL ENGINEERING, (2005), p.254-259

Ikumi, K., Tsutsumi, S., Assesment of Correlation between CT Values and Torque Values of Implant Installation, (2005).

Fukuda, S., Nakamura, T., Kishigami, Y., Endo, K., Azuma, T., Fujikawa, T., Tsutsumi, S., Shimizu, Y., New canine Spinal Cord Injury Model Free from Laminectomy, Brain Res Protoc., (2005), 14 (3) : 171-180.

Yu-Bong KANG, Duk-Young JUNG, Masatoshi TANAKA, Nobuyuki YOSHINO, Sadami TSUTSUMI and Ken IKEUCHI, Numerical Analysis of Three-Dimensional Cervical Behaviors in Posterior-oblique Car Collisions us-

- ing 3-D Human Whole Body Finite Element Model, JSME International Journal, Ser. C, Vol. 48, No. 4 (2005), pp.598-606.
- Jin, F-Z., Tsutsumi, S., Hyon, S-H. : Hydrostatic extrusion of Poly(L-lactide), Macromolecular Symposia **224**.93-104 (2005)
- Moon, H-L., Jin, F-Z., Lee, C-J., Tsutsumi, S., Hyon, S-H. : Novel carbon nanotube/Poly(L-lactic acid) nanocomposites ; Their Modulus, Thermal Stability, and Electrical Conductivity: Macromolecular Symposia : **224**. 287-295 (2005)
- Han, D-W., Kim, H-H., Son, H-J., Baek, H-S., Lee, K-Y., Hyon, S-H., Park J-C. : Protection of human fibroblasts from reactive oxygen species by green tea polyphenolic compounds. Key Engineering Materials **Vols.288-289** 665-668 (2005)
- Han, D-W., Kim, H-H., Lee, M-H., Baek, H-S., Lee K-Y., Hyon, S-H., Park, J-C. : Protection of osteoblastic cells from freeze/thaw cycle-induced oxidative stress by green tea polyphenol : Biotechnology Letters **27**. 655-660 (2005)
- Rah, D-K., Han, D-W., Hyon, H-S., Park, J-C. : Prevention of reactive oxygen species-induced oxidative stress in human microvascular endothelial cells by green tea polyphenol . Toxicol.Lett. **155** : 269-275 (2005)
- Han, D-W., Park, Y-H, Kim, J-K., Jung, T-G., Lee, K-Y., Hyon, S-H., Park J-C. : Long-term preservation of human saphenous vein by green tea polyphenol under physiological conditions. Tissue Engineering, **11**.(7-8).1054-1064 (2005)
- Ikeguchi, R, Kakinoki, R, Matsumoto, T, Hyon, S-H, Nakamura, T. : Peripheral nerve allografts stored in green tea polyphenol solution. Transplantation **79** 688-695 (2005)
- Matsumoto, T., Kakinoki, T., Ikeguchi, R., Hyon, S-H., Nakamura, T. : Optimal conditions for peripheral nerve storage in green tea polyphenol : an experimental study in animals. Journal of Neuroscience Methods 145 255-266 (2005)
- Mukaida, T., Urabe, K., Naruse, K., Akikawa, J., Katano, M., Hyon, S-H., Itoman, M : Influence of three-dimensional culture in type II collagen sponge on primary cultured and dedifferentiated chondrocytes. J Orthop Sci Sep ; 10 (5) : 521-8 (2005)
- Fukuda S, Nakamura T, Kishigami Y, Endo K, Azuma T, Fujikawa T, Tsutsumi S, Shimizu Y., New canine spinal cord injury model free from laminectomy. Brain Res Brain Res Protoc. 14(3) : 171-80(2005).
- Kim, I-D., Azuma, T., Ido, A., Moriuchi, A., Numata, M., Teramukai, S., Okamoto, J., Tsutsumi, S., Tanaka, K., Tsubouchi, H., Navigator-echo-based MR provides high-resolution images and precise volumetry of swine livers without breath holding or injection of contrast media, Liver Transplantation, 12(1) : 72-75(2005).
- Sakai K, Azuma, T., Koyamada K., Tsutsumi, S., Visualization of the Neural Pathway from DT-MRI Set. Proceedings of the 5th IASTED International Conference on Visualization, Imaging, and Image Processing 680-684 (2005).
- 酒井晃二, 東高志, 小山田耕二, 堤定美: DT-MRI データセットを用いた神経線維路の可視化—開始点の設定方法—, 可視化情報学会誌 2005 ; 25 : Suppl ; No.3 : VC11-7
- 浦山慎一, 杉本直三, 東 高志, 城尾文崇, 山本貴士, 福山秀直, 堤定美, 英保茂: 外部センサを用いた呼吸同期 4 次元 MR タギング法, 電子情報通信学会技術研究報告. 2005 ; 105 : 303 : 41-46
- 姜 有峯, 田中正利, 堤 定美, 車両の斜方追突時の頸部三次元挙動に関する数値シミュレーション, 第 17 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp.307-308,(2005)

2) 著 書

玄 丞休, 松村和明, 堤 定美: 歯根膜再生型インプラント, 「再生歯科のテクニックとサイエンスー歯周・審美・インプラントー」(吉江弘正, 宮本泰和 編集 クインテッセンス出版株式会社 東京)192-201(2005)

Hyon.S-H, : Some medical applications of biodegradable polymers. Proceeding 6th Field-Wise Seminar for Materials Engineering 1-10 (2005)

姜 有峯, 田中正利, 吉田宏昭, 堤 定美, 3次元人体 FEM モデルを用いた衝撃による頸部挙動解析と傷害予測, 情報処理, 第 46 巻, 第 12 号, pp.1368-1372,(2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

姜 有峯, 田中正利, 堤 定美, 車両の斜方追突時の頸部三次元挙動に関する数値シミュレーション, 第 17 回バイオエンジニアリング講演会(2005.1. 名古屋)

Kang, Y.-B., Tanaka, M., Tsutsumi, S. and Ikeuchi, K., The whiplash injury in rear-end collision using 3-D human whole body model, The 3rd IASTED International Conf. on BIOMEDICAL ENGINEERING, (Innsbruck, Austria Feb.2005)

Ikeguchi, R., Kakinoki, R., Matsumoto, T., Hyon, S-H., Nakamura, T. : Peripheral nerve allografts stored in green tea polyphenol solution. The annual meeting of American Orthopedic Research Society (2005.2.19-22 Washington)

Moon,S-I, Jin, F., Hyon, S-H., Tsutsumi, S. : Crosslinking of synthesis biodegradable polymers by γ -irradiation. The 229th ACS National Meeting (2005.3.13-17. San Diego)

米倉 藍, 武田吉史, 玄 丞休, 宮崎 浩: 繰り返し負荷の周波数が靱帯再建用培養組織の強度に及ぼす影響. 日本機械学会関西学生会学生員卒業研究発表講演会(2005.3.17. 京都)

武田吉史, 玄 丞休, 宮崎 浩: メッシュ状 Scaffold を用いた靱帯再建用培養組織の作成に関する研究. 日本機械学会関西支部第 80 期定時総会講演会(2005.3.19. 京都)

Takaba, K., Nemoto, S., Saji, Y., Jiang, C., Ikeda, T., Urayama, S., Azuma, T., Tsutsumi, S., Tabata, Y., Komeda, M., Induction of Arteriogenesis in Chronic Ischemic Myocardium by a Combination of bFGF and Omentopexy as Extra Cardiac Blood Source. 日本循環器学会第 69 回学術集会(2005.3.21. 神奈川)

Hyon, S-H., Jin, F., Tsutsumi, S. : Poly(L-Lactide)/Hydroxyapatite composite for bone fixation device. The 30th Annual Meeting of the Society for Biomaterials (2005.4.27-30. Memphis)

Moon, S-I., Jin, F., Hyon, S-H., Tsutsumi, S. : Preparation of crosslinked biodegradable films and fibers by gamma-irradiation. The 30th Annual Meeting of the Society for Biomaterials (2005.4.27-30. Memphis)

T. Oida, Y. Kang, T. Azuma, J. Okamoto, A. Amano, L. Axel, O. Takizawa, S. Tsutsumi, T. Matsuda, The measurement of anisotropic elasticity in skeletal muscle using MR Elastography, 13th ISMRM, (Miami, USA. May.2005)

Urayama, S., Axel, L., Okamoto, J., Azuma, T., Tsutsumi, S., Fukuyama, N., Theoretical Solutions of Transient Spin Dynamics in Coherent SSFP. The 13th Annual Meeting of ISMRM (Miami, USA, May, 2005)

隠浪康行, 小林哲生, 鄭 址旭, 大橋俊平, 濱田昌司, 長峯 隆, 福山秀直, 東 高志, 堤 定美, 脳磁図と機能的 MRIを用いた視覚野における複数神経活動の解析. 第 49 回システム制御情報学会研究発表講演会論文集

pp.233-234 (2005.5. 京都)

福田正順, 中村達雄, 岸上義弘, 早川克己, 遠藤克昭, 市原理司, 藤川孝満, 東 高志, 堤 定美, 大綱を用いた
イヌ脊髄損傷モデルの治療の試み. 第 105回日本外科学会(2005.5.11-13. 名古屋)

松村和明, 鷹羽浄顕, 米田正始, 玄 丞休: 緑茶カテキン(EGCg)処理による静脈グラフト新生内膜肥厚抑制効果
の基礎的研究. 第 2 回日本カテキン学会総会 (2005.6.5-6. 横浜)

金 宗潤, 松村和明, 玄 丞休: EGCg による移植免疫反応の抑制. 第 2 回日本カテキン学会総会(2005.6.5-6.
横浜)

玉田真規, 横山隆文, 澤井大輔, 金元哲夫, 玄 丞休: ポリ乳酸ステレオコンプレックス結晶(SC)の生成条件.
平成 17 年度繊維学会年次大会 (2005.6.8-10. 岐阜)

有馬奈美, 横山隆文, 澤井大輔, 金元哲夫, 玄 丞休: 光学純度の異なるポリ乳酸の延伸/熱処理による構造と物
性の変化. 平成 17 年度繊維学会年次大会 (2005.6.8-10. 岐阜)

文 成日, 玄 丞休, 堤 定美: Reactive modification of Poly(L-lactic acid) using Poly(dimethyl siloxane). 平成 17
年度繊維学会年次大会 (2005.6.8-10. 岐阜)

Fukuda, S., Nakamura, T., Kishigami Y., Azuma T., Hayakawa K., Nishio T., Endo, K., Ichihara S., Fujikawa T., Tsutsumi
S., Omental transposition therapy for spinal cord injury. 51st ASAIO (American Society for Artificial Internal Or-
gans) (2005.6.9-11. Washington DC)

鷹羽浄顕, 根本慎太郎, 姜 春力, 佐治嘉章, 宮下和季, 東 高志, 伊藤 裕, 堤 定美, 田畑泰彦, 池田 義,
米田正始: 重症冠動脈疾患に対する新たな治療戦略としてのバイオ CABG の研究開発とその臨床応用. 第
26 回日本炎症・再生学会(2005.7.13. 東京)

井前直人, 小林哲生, 鄭 址旭, 東 高志, 堤 定美: MR 拡散テンソル画像と機能的 MRI の併用による脳活動
領域解析の試み. 第 10 回認知神経科学学会大会 (2005.7. 京都)

福田正順, 中村達雄, 岸上義弘, 遠藤克昭, 早川克己, 市原 理司, 藤川孝満, 東高志, 堤定美, 西尾 健資: 有
茎大綱弁によるイヌ脊髄損傷モデルの治療. 第 26 回日本炎症・再生医学会(2005.7.12-13. 東京)

鷹羽浄顕, 根本慎太郎, 松村和明, 玄 丞休, 池田 義子, 米田正始: 緑茶カテキン(EGCg)移植前保存処理によ
る血管保存に関する基礎的検討. 第 4 回日本組織移植学会・学術集会(2005.8.27. 大阪)

鷹羽浄顕, 姜 春力, 根本慎太郎, 松村和明, 玄 丞休, 池田 義, 米田正始: 緑茶カテキン(EGCg)を用いた
静脈グラフト新生内膜肥厚防止液の開発. 第 8 回日本組織工学会(2005.9.1-2. 東京)

岩永康裕, 松本慎一, 米川幸秀, 野口洋文, 永田英生, 興津 輝, 金 宗潤, 松村和明, 玄 丞休: 緑茶ポリフェ
ノールのブタ臍島凍結保存における有用性. 第 8 回日本組織工学会(2005.9.1-2. 東京)

Ma, W., Lin, B., Hyon, S-H., Tsutsumi, S., Interface characteristics and mechanism analysis of osteointegration be-
tween bone tissue and surface modified titanium implants. 第 3 回日本再生歯科医学会学術大会および総会
(2005.9.3. 東京)

松村和明, 玄 丞休, 中島直喜, 堤 定美: ハイドロキシアパタイト固定化基材上での歯根膜細胞の機能発現. 第
3 回日本再生歯科医学会学術大会および総会 (2005.9.3. 東京)

Kim, J-Y., Kina, T., Iwanaga. Y., Matsumura, K., Hyon, S-H., : Attenuation of transplantation-related immune responses
by the polyphenolic compound, EGCg. The 7th International Conference on Cellular Engineering (2005.9.6-9.
Seoul)

Iwanaga. Y., Matsumura, K., Kim, J-Y., Hyon, S-H. : Effectiveness of polyphenol(the extract of green tea) for cryo-

- preservation of porcine islets. The 7th International Conference on Cellular Engineering (2005.9.6-9. Seoul)
- Lee, M-L., Han, D-W., Lim, H-R., Hyon, S-H., Park, J-C. : Inhibitory effects of epigallocatechin 3-0-gallate on rat aortic smooth muscle cell behaviors. The 7th International Conference on Cellular Engineering (2005.9.6-9. Seoul)
- Takaba, K., Kim, J-Y., Matsumura, K., Jiang, C., Nemoto, S., Komeda, M., Tsutsumi, S., Hyon, S-H. : Epigallocatechin-3-gallate prevents neointimal hyperplasia in rabbit vein grafts. The 7th International Conference on Cellular Engineering (2005.9.6-9. Seoul)
- 東 高志, 川崎玲子, 中井隆介, 浦山慎一, 岡本 淳, 瀧澤 修, 福山秀直, 堤 定美, 高分解能 3D MR・2D MR 画像を利用した骨格筋の外力による構造変化の解析. 第 33 回日本磁気共鳴医学会大会 (2005.9.28-1. 東京)
- 浦山慎一, 岡本淳, 東高志, 堤定美, 福山秀直, 杉本直三, TARD (Transient Artifact Reduction with Dispersion of phase)法における最適 RF 位相増分角測定法, 第 33 回日本磁気共鳴医学会大会 (2005.9.28-1. 東京)
- 笈田武範, 姜 有峯, 東 高志, 岡本 淳, 天野 晃, Leon Axel, 瀧澤 修, 堤 定美, 松田哲也, MR Elastography を用いた筋線維の異方性弾性特性の計測. 第 33 回日本磁気共鳴医学会大会 (2005.9.28-1. 東京)
- 井前直人, 小林哲生, 鄭 址旭, 酒井晃二, 小山田耕二, 東 高志, 堤 定美, fMRI/DTI による脳活動領域解析に関する検討. 第 33 回日本磁気共鳴医学会大会 (2005.9.28-1. 東京)
- 隠浪康行, 小林哲生, 鄭 址旭, 大橋俊平, 濱田昌司, 長峯 隆, 福山秀直, 東 高志, 堤 定美, 複数皮質活動の動的イメージングのための fMRI-MEG 統合解析法. 生体医工学シンポジウム 2005 (2005.9.27-8. 大阪)
- 蔡 毅, 姜 有峯, 鄭 徳泳, 堤 定美, 生体表層軟組織の非接触式粘弾性計測法の開発に関する研究, 第 32 回日本臨床バイオメカニクス学会, (2005.10. 札幌)
- 鷹羽浄顕, 姜 春力, 根本慎太郎, 松村和明, 玄 丞休, 池田 義, 米田正始, 緑茶カテキン (EGCg) 処理による静脈グラフト新生内膜肥厚抑制効果に関する検討. 第 58 回日本胸部外科学会定期学術集会 (2005.10.5-7. 岡山)
- 鷹羽浄顕, 根本慎太郎, 姜 春力, 佐地嘉章, 宮下和季, 北郷明成, 東 高志, 山本雅哉, 伊藤 裕, 堤 定美, 田畑泰彦, 池田 義, 米田正始, 高度び慢性冠動脈病変に対する新術式バイオ CABG の慢性心筋虚血モデルにおける臨床前研究. 第 58 回日本胸部外科学会定期学術集会 (2005.10.7. 岡山)
- Tetsuo Kobayashi, Yasuyuki Innami, Jiuk Jung, Shunpei Ohashi, Shoji Hamada, Takashi Nagamine, Hidenao Fukuyama, Takashi Azuma and Sadami Tsutsumi. Development of an integrative fMRI-MEG technique for dynamic neuroimaging of multiple cortical activities. The 16th World Congress of the International Society for Brain Electromagnetic Topography, (Bern, Switzerland, 2005, 10)
- 川添 剛, 鈴木 茂彦, 森本尚樹, 玄 丞休: ポリフェノールを用いた皮膚組織の保存. 第 14 回日本形成外科学会基礎学術集会 (2005.10.14-15. 東京)
- Matsumura, K., Takaba, K., Jiang, C., Nemoto, S., Komeda, M., Tsutsumi, S., Hyon, S-H. : Green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, prevents neointimal hyperplasia in a rabbit vein graft model. The 8th Annual Meeting of Tissue Engineering Society International (2005.10.22-25. Shanghai)
- 酒井晃二, 東 高志, 小山田耕二, 堤 定美, “DT-MRI データセットを用いた神経線維路の可視化—開始点の設定方法—”, 可視化情報学会, 第 11 回ビジュアリゼーションカンファレンス (2005.10.21. 東京)
- Takaba, K., Matsumura, K., Miwa, S., Yamazaki, K., Nishina, K., Nomoto, T., Toyokuni, S., Hyon, S-H., Ikeda, T., Komeda, M. : Control of the peri-operative oxidative stress enables fast recovery from myocardial ischemic damage in cardiac surgery. International Redox Network 2005 (2005.11.9-11. kyoto)

米倉 藍, 武田吉史, 玄 丞休, 宮崎 浩: 培養再生靱帯様組織の力学的特性に及ぼす繰り返し負荷の周波数の影響. 日本機械学会第16回バイオフィロントニア講演会(2005.11.10. 草津)

金 学嬉, 須賀井 一, 松村和明, 川添 剛, 鈴木茂彦, 森本尚樹, 玄 丞休: 緑茶ポリフェノール EGCG を用いた皮膚組織の長期保存. 第12回日本臓器保存生物医学会総会(2005.11.25-26. つくば)

玄 丞休, 松村和明, Cho, H-H., 中島直喜, 堤 定美: 緑茶ポリフェノールを用いた蛋白質のナノハイブリッド化. 第27回日本バイオマテリアル学会大会(2005.11.28-29. 京都)

後藤知代, 大澤恭子, 速水 尚, 松村和明, 玄 丞休, 畑中良太, 本津茂樹, 堤 定美: レーザーアブレーション法により PVA ハイドロゲル上への超薄膜アパタイト被覆. 第27回日本バイオマテリアル学会大会(2005.11.28-29. 京都)

Ohkawa, T., Nakamura, K., Itoman, M., Jin, F., Hyon, S-H., Tsutsumi, S. : Evaluated of the γ -ray radiasthenized cross-linked PLLA and PLLA/HA In Vivo. 18th International Symposium of Ceramics in Medicine The Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (2005.12.5-8. Kyoto)

2) 講演・シンポジウム

Hyon, S-H. : Some medical applications of biodegradable polymers. 「6th Field-wise Seminar for Materials Engineering on Biomaterials, Nanomaterials. Advanced Materials & Composites」. AUN/SEED-Net, JICA (招待講演)(2005.5.16-17)

玄 丞休: 生体材料のナノ構造制御「KRI コンファレンス&ワークショップ'05. (招待講演)(2005.5.26-27)

Hyon, S-H. : Recent development situation of the biodegradable polymers. 「B-BRAUN'S Conference (招待講演)(2005.11.15 GERMANY)

玄 丞休: 緑茶ポリフェノールを用いた移植用生体組織の長期保存「第55回人工関節の機能高度化研究会」(招待講演)(2005.12.17 岡山)

ナノバイオメカニズム研究領域 Department of Nano-Biomechanism

分野主任 池内 健

Prof. Ken Ikeuchi

【研究概要】

医療の目的は単に病気を治療することではなく、本来の機能と生活の質を再生させることである。本分野では、機械工学を医療に応用して、生体本来の機能を再建するための医療技術を開発・研究しており、その内容は関節と血管内治療に大別される。前者に関しては超音波、エバネセント波などを用いて軟骨の力学特性を計測する技術を開発し、整形外科医と協力して軟骨変性の診断、移植、再生軟骨の評価を行った。後者に関しては医療機器メーカー、循環器系医師と共同開発して脳動脈用カテーテルの患部への誘導技術を研究するとともに術前術中に経路予測ので

きるシミュレータを開発した。以下に個々の研究テーマを示す。

1. 脳卒中治療用カテーテルのナビゲーション

脳出血や脳梗塞の治療のために開頭を必要としない血管内治療が普及しつつあるが、このような低侵襲治療は術者の高度な熟練と勘に頼るため、術者が未熟であれば危険が伴うことになる。そこでカテーテルの挿入と治療をより安全にするために、先端部に装着した微小な磁石(直径2 mm)によって形成される磁界を体外に設置した5個の磁気センサーによって計測するシステムを開発した。センサーの情報をもとにニューラルネットワークによって3次元空間におけるカテーテル先端の位置と姿勢角を高精度で測定することができた。

2. 超音波による軟骨変性の早期発見

生体組織の物性を計測するために超音波パルスの反射波をウェーブレット変換する解析法を用いて軟骨表面からの反射波強度と力学特性の相関関係を調べることで動的弾性率、不均質性、厚さを計測する技術を完成させた。これにより関節軟骨の成熟と老化の過程を解明した。また変形性関節症の原疾患である軟骨の変性を測定できる技術確立して移植軟骨や再生軟骨の機能評価に応用した。さらに試作した超音波関節鏡を臨床診断に応用して軟骨変性の早期発見を試みた。以上の測定技術により、変形性関節症の移植、再生治療の進歩に貢献した。

3. エバネセント波による軟骨表面の計測と潤滑機構の解明

軟骨をガラスまたは金を蒸着したプリズム面上ですべらせ、エバネセント波によって界面から100 nm以内の成分を調べた。正常な軟骨では表面に多量の水を含むゲル層が存在し、その水和潤滑によって低摩擦状態が保たれていた。一方、表面層を除去した軟骨ではコラーゲンが表面に露出して高摩擦であった。軟骨表面の水和層が潤滑に重要な役割を果たすことを実証し、軟骨表面を構成する成分を測定することによって変性を早期診断できる可能性を示し、変形性関節症の早期診断について一歩を踏み出した。

4. 血管内視鏡用光学式触覚センサーの開発

赤外線を利用して内視鏡の先端に加わる三分力を測定する新しい触覚センサーを開発した。血管内視鏡の先端に赤外線フィルターのマーカーを装着し、画像処理によってその位置と面積を測定した。マーカーの変位は横方向力のベクトルに対応し、その面積変化は軸方向力に対応しているので三分力を正確に測定できる。赤外線フィルターを用いるため触覚センサーは内視鏡画像に影響しない。本技術によって血管を損傷することなく内視鏡を安全に挿入することが可能となった。

5. 脳血管用カテーテル用手術シミュレータの開発

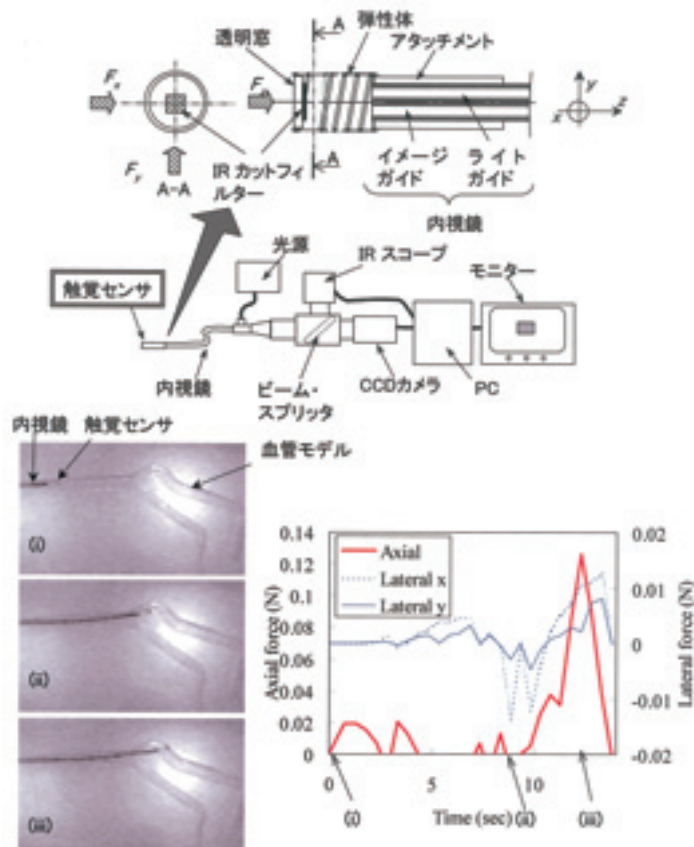
実験的に決定した血管の変形特性、内壁の摩擦特性などに基づく血管カテーテル系のモデルを作成した。これを用いて脳動脈の血管内手術における術前、術中の経路予測および教育に用いるシミュレータを開発した。本シミュレータが脳動脈治療の安全向上に有効であることが臨床的に確認されただけでなく、血管の形状に応じたガイドワイヤーの選択にも有効であった。

6. 歯科口腔機能の再生のための補綴物製作システムに関する研究

高齢化等による歯科口腔機能の損傷および低下の再生に用いられる補綴材料は生体親和性の良い材質のものが用

いられるが、その加工法はしばしば困難であることがある。そこで、このような材料の成形加工法を追求し、生物学的適合性、力学的適合性および形態的適合性に優れた歯科補綴物の製作システムについて研究している。

The main goal of medical therapy is not only to cure diseases but also to reproduce the original function and high quality of life. In the division of Nano-Biomechanism, we have studied and developed new technologies to reconstruct the inherent ability of human being by applying mechanical engineering to medical treatment. New technologies using ultrasound and evanescent wave were developed to measure mechanical properties of articular cartilage. They were applied to *in vivo* experiments and clinical tests, and proved to be useful for diagnosis of early degeneration of cartilage, for assessment of cartilage after osteochondral plasty and for assessment of regenerated cartilage. For intravascular treatment, new technologies to navigate catheters in intracranial arteries were developed. A simulator was developed to predict the route of intravascular catheter before and during operation. The research activities of the Department of Biomechanical Engineering in 2005 are summarized as follows :



(上)内視鏡用触覚センサの構造
(下左)触覚センサを内視鏡につけて血管モデルに挿入したときの動き
(下右)(下左)の各状態でのセンサ出力

1. Magnetic system for navigating intracranial catheter

We have developed a system to measure position and attitude angle of intracranial catheter for intravascular treatment. The magnetic field from a miniature magnet (2 mm in diameter) at the top of the catheter was measured with highly sensitive probes located out of the body. neural network was used to estimate location of the catheter from the magnetic field.

2. Ultrasonic measurement of articular cartilage to detect cartilage degeneration in early stages

We have developed a new ultrasonic technology to measure tissues by use of wavelet transform. Dynamic modulus of elasticity, heterogeneity and thickness of articular cartilage were measured by reflected waves of ultrasonic pulses correlating highly with properties of articular cartilage. Regenerated and grafted cartilages were also measured by the same method. In clinical application, the arthroscope with ultrasonic probe has proved effective in detecting softening of cartilage associated with degeneration and early stage of osteoarthritis.

3. Study of cartilage surface and joint lubrication

In a human body, hydrated surface layers exist on articular cartilage, tendon/sheath interface and intestine wall. During sliding, the layer protects the surface by hydration lubrication. Constituents of articular cartilage under sliding were measured within the range of 100 nm from the interface with evanescent waves. The result shows that chondroitin sulfate attaching the cartilage surface contributes to low friction of natural joints. It was also found that collagen fibers exposing to the surface cause high friction when the surface layer was removed. Mechanism of hydration lubrication in joint was thus clarified and diagnosis of cartilage degeneration by evanescent wave was made possible.

4. Development of infrared tactile sensor for vascular endoscope

A Novel optical tactile sensor was developed to measure force vectors applied to the head of vascular endoscopes. A marker of infrared filter was attached to the head of the endoscope. Displacement and area change of the marker were measured with image processing technology. As displacement of the marker correlates transverse forces and the area change correlates axial force, the three elements of the force vector were determined exactly by this method. The force measurement did not damage endoscope image because the infrared filter was invisible. The tactile sensor contributes to prevention of vascular injury and safe navigation of endoscopes.

5. Development of simulator for intracranial catheter

A computer model of arteries and an intracranial catheter was established with mechanical properties of the arteries and frictional properties between the endothelium and the catheters based on the experimental results. Then, a surgical simulator was developed to predict the route of the catheter before and during operation of intravascular surgery of cerebral artery. The simulator was proved useful not only to clinical application but also to selection of optimal guide wires corresponding to profile of the arteries.

6. Development of materials processing systems for dental prostheses

Materials processing systems, especially for metal materials, in a dental field are investigated. The purpose of this study is to reproduce the oral function by establishing production systems of dental prostheses, which have excellent biological-, medical- and morphological-compatibility.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

都賀谷紀宏, 山本吉保, 友西康輔, 小田切朋和, 北山陽子, 日下部暁, 島田雅喜, 森 茂光, 久保文信, 上野貴之, 岩川泰平, 橋野利一, 岡谷学芳, 平岩健介, 中谷幸一, 北見賢司, 朱 可希, 岩佐達也, 松永 章, 風間堅一, 塚原敏彦: 銀合金を用いた鋳造コアの鋳肌荒れを検証する. 歯科技工, **33**(11): 1369-1393 (2005)

Hattori, K., Ikeuchi, K., Morita, Y., Takakura, Y.: Quantitative ultrasonic assessment for detecting microscopic cartilage damage in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2005. **7**: 38-46 (2005)

Hattori, K., Takakura, Y., Ohgushi, H., Habata, T., Uematsu, K., Yamauchi, J., Yamashita, K., Fukuchi, T., Sato, M., Ikeuchi, K.: Quantitative ultrasound can assess the regeneration process of tissue-engineered cartilage using a complex between adherent bone marrow cells and a three-dimensional scaffold. *Arthritis Res Ther* 2005. **7**: 552-559 (2005)

- Hattori, K., Takakura, Y., Ishimura, M., Tanaka, Y., Habata, T., Ikeuchi, K. : Differential acoustic properties of early cartilage lesions in living human knee and ankle joints. *Arthritis & Rheumatism*. **52-10** : 3125-3131 (2005)
- Hattori, K., Takakura, Y., Ohgushi, H., Habata, T., Uematsu, K., Ikeuchi, K. : Novel ultrasonic evaluation of tissue-engineered cartilage for large osteochondral defects-non-invasive judgement of tissue-engineered cartilage . *J Orthop Res*. **23** : 1179-1183 (2005)
- Takashima, K., Yoshinaka, K., Okazaki, T., Ikeuchi, K. : An endoscopic tactile sensor for low invasive surgery . *Sensors and Actuators A*. **119** : 372-383 (2005)
- 高嶋一登, 葭仲 潔, 池内 健 : 内視鏡用光学式触覚センサに関する研究. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*. **26** : 449-456 (2005)
- Naka, M, H., Morita, Y., Ikeuchi, K. : Influence of proteoglycan contents and of tissue hydration on the frictional characteristics of articular cartilage . *Proc. ImechE. Part H : J.Eng Med*. **219** : 175-182 (2005)
- Naka, M, H , Hattori, K., Ohashi, T., Ikeuchi, K. : Evaluation of the effect of collagen network degradation on the frictional characteristics of articular cartilage using a simultaneous analysis of the contact condition. *Clin. Biomech*. **20** : 1111-1118 (2005)
- Naka, M, H , Hattori, K , Ikeuchi, K : Experimental diagnosis of articular cartilage using one apparatus based on evanescent waves. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*. **26** : 53-58 (2005)
- Harada, Y., Tomita, N., Nakajima, M., Ikeuchi, K., Wakitani, S. : Effect of loadong and joint immomilization for spontaneous repair of osteochondral defect in the knees of weightless (tail suspension) rats . *J Orthop Sci*. **10** : 508-514 (2005)
- 山本浩司, 甲斐元崇, 玉島康優, 園部正人, 森田有亮, 池内 健, 小泉孝之, 辻内伸好, 玉田 靖, 富田直秀 : 再生軟骨の摩擦・摩耗特性. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*. **26** : 97-102 (2005)
- Jung, D., Tsutsumi, S., Nakai, R., Ikeuchi, K., Sekel, R. : Prediction of peroprosthesis resorptive bone remodeling based on the high compressive stress on the shape of cementless acetabular cup. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*. **26** : 239-246 (2005)
- Jung, D., Tsutsumi, S., Nakai, R., Ikeuchi, K., Sekel, R. : Numerical estimation of periprosthesis resorptove bone remodeling caused by high compressive stress in relation to bony ingrowth condition. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*. **26** : 247-255 (2005)

2) 著 書

- Ikeuchi, K., Mackova, H., Morita, Y. : Wear process under concentrated contact in alumina/alumina hip joint. 「LIFE CYCLE TRIBOLOGY」(Dowson, D., Priest, M., Dalmaz, G., Lubrecht, A, A., Elsevier, Amsterdam) 179-184 (2005)
- 池内 健, 高嶋一登, 葭仲 潔 : 画像処理を用いた内視鏡用触覚センサ 「超五感センサの開発最前線」(ブッカーズ編, エヌ・ティー・エス, 東京) 331-340 (2005)

3) 総 説

- 都賀谷紀宏 : 歯科技工における溶接技術～レーザー溶接, TIG 溶接, プラズマ溶接～. *日本歯技*. 435 : 1-7 (2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Ikeuchi, K., Mackova, H., Morita, Y. : An edge-on-cylinder wear test simulating destructive wear in ceramic/ceramic hip joint. The 6th International Symposium on Eco-materials Processing and Design (2005.1.16-18 Jinju)
- 池内 健, M. H. Naka, 朝日伸一, 大橋徹夫: 軟骨表面層における水和潤滑. 第44回日本生体医工学会大会 (2005.4.25-27. つくば)
- Ikeuchi, K., Naka, M, H., Asahi, S., Fuwa, Y. : Mechanism of hydration lubrication in human joints. International Tribo-logy Conference, Kobe 2005 (2005.5.29-6.2. Kobe)
- 高嶋一登, 下村玲威, 鬼頭孝之, 葭仲 潔, 池内 健: カテーテル挿入時におけるカテーテルと血管との接触と摩擦に関する研究. 第17回バイオエンジニアリング講演会 (2005.1.22-23. 名古屋)
- 高嶋一登, 葭仲 潔, 池内 健: 画像処理を用いた内視鏡用触覚センサ. 第44回日本生体医工学会大会 (2005.4.25-27. つくば)
- Takashima, K., Yoshinaka, K., Ikeuchi, K. : Vision-based tactile sensor for endoscopy. The First International Conference on Complex Medical Engineering-CME2005 (2005.5.15-18. Takamatsu)
- Takashima, K., Shimomura, R., Yoshinaka, K., Ikeuchi, K. : Experimental study on contact and friction between catheter and blood vessel. 5th Kobe International Forum : Biotribology 2005 (2005.6.3. Kobe)
- 高嶋一登, 鬼頭孝之, 森 浩二, 池内 健: スtentと血管モデルの接触状態の可視化. (社)日本機械学会 2005 年度年次大会 (2005.9.19-22. 調布)
- 名嘉マルコ寛, 三輪啓介, 池内 健: 表面プラズモン共鳴を用いた関節軟骨の潤滑の評価. 第17回バイオエンジニアリング講演会 (2005.1.22-23. 名古屋)
- Naka, M, H., Hattori, K., Miwa, K., Ikeuchi, K. : Evaluation of the frictional properties of degenerated articular cartilage using evanescent waves. 5th Kobe International Forum : Biotribology 2005 (2005.6.3. Kobe)
- 寺田大樹, 村永陽介, 豊田一実, 高嶋一登, 葭仲 潔, 池内 健: カテーテルの位置検出のための磁気センサシステムの構築. (社)日本機械学会2005年度年次大会 (2005.9.19-22. 調布)
- 森 浩二, 中川泰彰, 黒木裕士, 山本圭一郎, 中村孝志, 池内 健, 斎藤 俊: 関節軟骨の変性が超音波測定におよぼす影響. 第17回バイオエンジニアリング講演会 (2005.1.22-23. 名古屋)
- 葭仲 潔, 廣瀬貴世, 高嶋一登, 鷺尾利克, 鎮西清行, 池内 健, 水原和行: 磁場センサによる無侵襲体内位置計測に関する研究. 第44回日本生体医工学会大会 (2005.4.25-27. つくば)
- 村瀬晃平, 山田裕士, 吉野信之, 堤 定美, 池内 健: 三次元 FEM 解析による膝関節の衝撃応答. 第31回日本臨床バイオメカニクス学会 (2005.10.28-29. 札幌)
- 姜 有峯, 田中正利, 堤 定美, 池内 健: 車両の斜方追突時の頸部三次元挙動に関する数値シミュレーション. 第17回バイオエンジニアリング講演会 (2005.1.22-23. 名古屋)
- 花谷重守, 水野行博, 都賀谷紀宏, 細井紀雄: レーザー照射による純チタン製金属歯の表面改質. 第17回日本レーザー歯学会学術大会 (2005.10.29-30. 新潟)

2) 講演・シンポジウム

- 都賀谷紀宏: 21世紀型歯科技工の在り方—レーザー溶接は歯科技工の未来を拓く—. 第116回北海道歯科技工学

術研修会 (2005.1.22. 札幌)

都賀谷紀宏：レーザー溶接最前線ー基礎から臨床までー，歯科技工フォーラム 2005 (2005. 1.30. 東京都)

都賀谷紀宏：溶接について～レーザー溶接，TIG 溶接，プラズマ溶接の違いについて～，第 152 回歯科鑄造研究会
(2005.5.28. 大阪市)

都賀谷紀宏：技工学と理工学，平成 17 年度日本歯科理工学会近畿・中四国支部夏期セミナー(シンポジウム「理工
学と関連瓦解・企業との連携」) (2005. 8.20. 広島市)

都賀谷紀宏：21 世紀型歯科技工の在り方，松風歯科クラブ臨床講座 (2005.10.2. 横浜)

寄附研究部門

組織分化制御学研究部門 Endowed Chairs Department of Morphoregulation

特任助教授 平井 洋平

Assoc. Prof. Yohei Hirai

【研究概要】

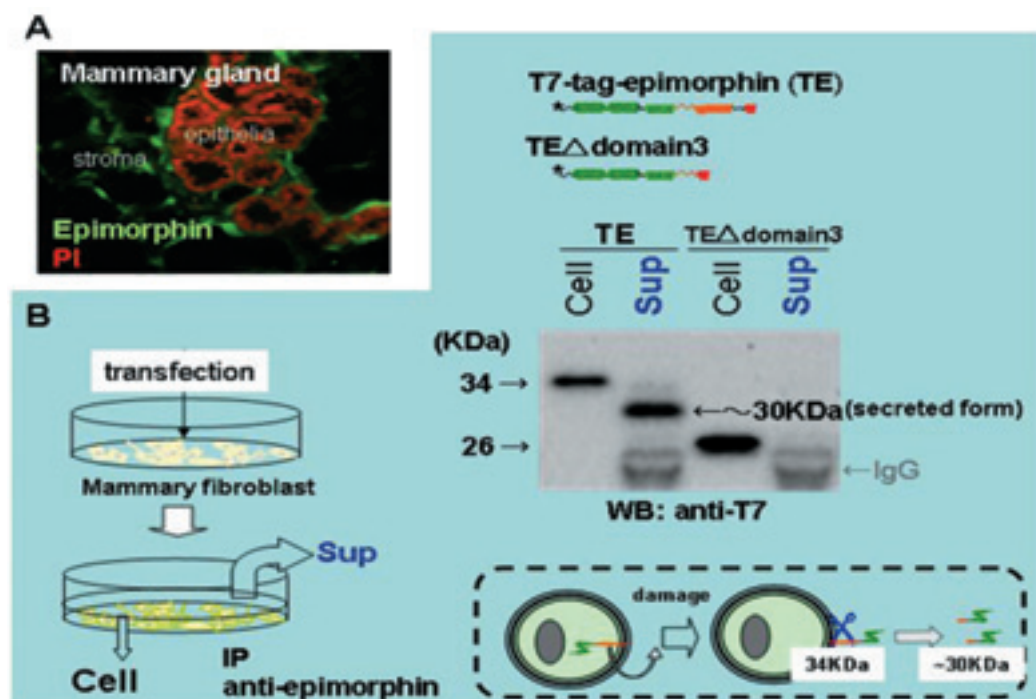
組織を構成する機能細胞は(非接着性のものを除いて)生体内で互いに規則的に接着・連絡し合いながら高次の組織構造体の中で巧妙に機能調節しており、再生医療の早期実現のためには細胞が有機的に繋がった組織構造体の構築誘導ならびにその形態制御が必要である。

エピモルフィン(EBF)は1992年に見出された間質細胞由来の形態形成誘導因子であり、種々の臓器で上皮組織に直接作用し組織構築を促すと同時にその形態を制御する。EBFはシグナルペプチドを持たずC末端に膜結合ドメインを有する一方で、液性因子として強力に上皮の形態形成を誘導するため、その作用機序の解明は組織化メカニズムの新しい概念を確立できる可能性がある。我々の研究室ではこのEBFを1つのモデル蛋白質として捕らえ、その作用機序を明らかにする試みを継続している。本年度は、EBFがどのようにして細胞外に効率的に提示・分泌されるか、また、上皮細胞に存在するEBFレセプターは何かについての解析を行なった。その結果、EBFは細胞が損傷を受けた際に効率よく細胞外に提示されること、細胞外に提示されたものは速やかにMMP様のプロテアーゼで膜結合ドメインが切除されること、こうして分泌されたものは上皮細胞上で α V鎖を含むインテグリンに結合することが明らかになった。実際に形態形成という生命現象がアポトーシスによる細胞死を伴う事を考えると、細胞損傷が一連のEBFの細胞外機能発揮に不可欠か否かは不明であるが、少なくとも1つのcueとして重要なものと想像される。今後、さらにEBFについての解析を継続すると共に、これまで内外で蓄積された形態形成に係わる分子群の知見も取り入れ上皮組織の精密な形態制御を試みる。また、研究対象とする細胞を、霊長類の幹細胞ならびにそれを機能分化させて得る正常細胞などに拡張する。

(文責 平井)

第二のテーマとして、皮膚上皮細胞の密着結合の形成過程の解析を行っている。創傷治癒は組織再生の中でも古くから研究がなされている現象である。その過程では傷の周辺の細胞が傷を埋めるべく移動し、さらにこの移動してきた細胞がその新しい周辺環境に応じて分化することが知られている。この細胞移動の過程では、個々の細胞において細胞間、細胞-細胞外基質間の接着が高度に制御されることが重要である。近年、c-Jun N-term Kinase (JNK)が後者の制御に関与していることが報告された。その一方で、前者の制御機構については未だ不明な点が多い。最近、私はヒト皮膚由来のHaCaT細胞をJNKの阻害剤存在下で培養すると、密着結合の構成因子であるZO-1の局在が変化することを見いだした。この結果は、主要な細胞間接着装置の一つである密着結合の形成過程が、JNKによって制御されている可能性を示唆する。この現象を分子レベルで理解することは、創傷治癒過程での細胞間接着の制御機構の理解につながると考えられる。さらに、本研究で得られた知見は再生医療の分野でも活用されることが期待される。

(文責 青野)



A; マウス乳腺(妊娠 14 日目)におけるエピモルフィンの発現。エピモルフィンの発現は主に間質で認められる(緑)。

B; 乳腺間質由来の繊維芽細胞からのエピモルフィンの分泌。タグを付加したエピモルフィン(TE)を細胞に導入すると～30 KDa の C 末端が切除されたものが培養液中から検出される。この切断は C 末端付近の domain3 配列に特異的であり(TEΔ domain3 を導入した場合には見られない)、可溶性エピモルフィンの分泌はトランスフェクションで細胞が損傷を受けた場合に大量に検出される。

Epithelial cells perform their physiological functions by organizing into three-dimensional tissue structures. One of our laboratory focuses is on a protein called epimorphin (Hirai et al., Cell, 1992), that we have shown to stimulate epithelial cells to organize into three-dimensional structures and undergo functional differentiation *in vitro*. Although epimorphin lacks a signal peptide for secretion and has a transmembrane domain at the C-terminus, this protein is released from the stromal fibroblast and acts as a morphoregulatory protein for epithelial cells. By understanding the molecular mechanisms underlying epimorphin's action this may establish a novel concept regarding stromal influence on epithelial behaviors. This year, we addressed how epimorphin is presented at the outer cell surface without a signal peptide, secreted to pass through the basement membrane and captured by the target epithelia. We found that 1) cellular damage leads to extracellular projection of epimorphin, 2) extracellular epimorphin is cleaved near the C-terminal hydrophobic domain to be secreted, and 3) α V-containing integrin on the target epithelia binds to this secreted epimorphin. Given that active tissue morphogenesis includes the process of apoptosis in certain cellular populations, cellular damage-dependent epimorphin release could be an important mechanism allowing epimorphin's extracellular action, albeit other mechanisms may also exist. By combination of epimorphin with other molecules for morphogenesis we will try to establish technologies to control the morphological differentiation of various tissues. The target cells mainly used in the lab will include primate ES cells and its epithelial derivatives. (By Hirai, Y.)

Another project we are working on is the analysis of tight junction formation of keratinocyte. The wound healing is one of the regeneration systems that are intensively studied on. During this process, cells surrounding the wound move directionally toward this wound. For this directional moving, cell-cell and/or cell-ECM interaction are regulated cooperatively. Recent study demonstrated that cell-ECM interaction is regulated by the JNK, c-Jun N-term kinase.

Meanwhile regulatory mechanism of cell-cell interaction during this process is still unclear. Recently, we found that the localization of ZO-1, one of the components of tight junction, change dramatically in HaCaT, human epidermal keratinocyte cell line, when this cell line is cultured with JNK inhibitor. This result suggests that the tight junction formation of HaCaT is repressed by JNK activity. Now we are analyzing the molecular mechanisms underlying this process for expecting that this study uncover the regulatory mechanism of cell-cell interaction during the wound healing.

(By Aono, S.)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Oka, Y., Sato, Y., Tsuda, H., Hanaoka, K., Hirai, Y. and Takahashi, Y. : Epimorphin acts extracellularly to promote cell-sorting and aggregation during the condensation of vertebral cartilage. Dev. Biol. in press
- Bascom, J.L., Fata, J.E, Hirai, Y., Sternlicht, M.D. and Bissell, M.J. : Epimorphin overexpression in the mouse-mammary gland promotes alveolar hyperplasia and mammary adenocarcinoma. Cancer Res. **65**, 8617-8621 (2005)
- Hirai, Y., Takebe, K. and Nakajima, K. : Structural optimization of pep7, a small peptide extracted from epimorphin, for effective induction of hair follicle anagen. Exp. Dermatol **14**, 692-699 (2005)
- Qin J., Takahashi, Y., Isuzugawa, K., Imai, M., Yamamoto, S., Hirai, Y. and Imakawa, K. : Regulation of embryo outgrowth by a morphogenic factor, epimorphin, in the mouse. Mol Reproduction and Development. **70**. 455-463 (2005)

2) 著書・総説

- 武田裕嗣・平井京子・平井洋平：表皮細胞の発生・再生 キーワードで理解する発生・再生イラストマップ 羊土社 p.102-107 (2005)
- 平井洋平：エピモルフィンの毛髪組織への影響と発毛剤開発への可能性 アンチエイジングシリーズ1「白髪・脱毛・育毛の実際」ブッカーズ p237-248 (2005)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 講演・シンポジウム

- Hirai, Y., Transition from company employee to academic scientist in industry-university cooperation. Japan-UK High Technology Industry Forum (2005.5.24. Osaka)
- Iizuka, M., Sasaki, K., Hirai, Y., Shindo, K., Sagara, S., Itou, H., Horie, Y., and Watanabe, S. Morphogenic protein epimorphin prevents apoptosis and enhances wound repair in intestinal epithelial Cells. 10 th US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century (2005.6.24. Kyoto)

技 術 部

Division of Technical Support

【研究支援概要】

再生医科学研究所における研究支援の一環として、病理組織標本作製を行っている。

2005年1月より12月末までに12分野318件と年々分野、件数、染色種類ともに増えてきた。再生実験という特殊な組織標本作製、染色にも独自の工夫を重ね、各々の研究者の方の要望に応じてきた。

- ・パラフィン切片作製、凍結切片作製(川本法も含む)、ブロックの作製、脱灰標本の作製
- ・一般染色 (Hematoxylin-Eosin stain)
- ・特殊染色 (Azan stain, Alcian blue stain, Berlin blue stain, Dahl's method, Elastica-Van Gieson stain, Kluver-Barrera stain, Masson's trichrome stain, Nissl's stain, Toluidine blue stain, Safranin O-Fast green stain, Villanueva bone stain, von Kossa's method, Silver stain)
- ・免疫染色

一方、6月3、4日実験病理組織研究会第12回総会、学術集会ではHE染色のコントロールサーベイに参加し染色技術のレベル確認をおこなった。8月3、4日第30回組織細胞化学会講習に参加し、免疫組織化学や凍結標本作製川本法についてさらにふかめ、9月には実験病理組織技術研究会第5回関西西部会病理技術研修会で発表をおこなうなど、技術向上につとめてきた。また長崎大学で病理組織標本作製についての研修および技術交流をおこなってきた。

標本作製業務とあわせて、衛生管理者の資格を取得し、巡視、毒劇物管理調査等々、研究所の安全衛生に関する業務もおこなっている。

【業 績 目 録】

◆ 誌上発表 ◆

Fu X., Korenaga T., Fu L., Xing Y., Guo Z., Matsushita T., Hosokawa M., Naiki H., Baba S., Kawata Y., Ikeda S., Ishihara T., Mori M., Higuchi K. : Induction of AApoAII amyloidosis by various heterogeneous amyloid fibrils. FEBS Lett. 563 : 179-184 (2004)

Korenaga T., Fu X., Xing Y., Matsushita T., Kuramoto K., Syumiya S., Hasegawa K., Naiki H., Ueno M., Ishihara T., Hosokawa M., Mori M., Higuchi K. : Tissue distribution, biochemical properties and transmission of mouse type A AApoAII amyloid fibrils. Am J Pathol. 165 : 1597-1606 (2004)

Chiba Y., Yamashita Y., Hirayoshi K., Ueno M., Fujisawa H., Akiguchi I., Matsushita T., Kogishi K., Satoh M., Shimada A., Hosokawa M. : Mitochondrial Alterations and a Higher Oxidative Status in Cultured Fibroblast-like Cells from Senescence-accelerated Mice. In : The senescence-accelerated mouse (SAM) : An animal model of se-

nescence (Eds. Nomura Y., Takeda T., Okuma Y.), Elsevier, Amsterdam : 255-258 (2004)

Toichi E., Matsushita T., Higuchi K., Hosokawa T., Hosokawa M., Hosono M. : Relationships between Immune Activities, Senile Amyloidosis and Life-span in Hybrids of SAMP1 and B10BR Mice. In : The senescence-accelerated mouse (SAM) : An animal model of senescence (Eds. Nomura Y., Takeda T., Okuma Y.), Elsevier, Amsterdam : 357-361 (2004)

Fu X., Korenaga T., Xing Y., Fu L., Guo Z., Matsushita T., Hosokawa M., Naiki H., Mori M., Higuchi K. : Induction of AApoAII and AA amyloidosis by the injections of various amyloid fibrils. In : The senescence-accelerated mouse (SAM) : An animal model of senescence (Eds. Nomura Y., Takeda T., Okuma Y.), Elsevier, Amsterdam : 383-386 (2004)

◆ 学会，研究発表 ◆

Korenaga T., Fu X., Mori M., Sawashita J., Naiki H., Matsushita T., Higuchi K. : Transmission of mouse AApoAII amyloidosis from mother to pups. Xth International Symposium on Amyloidosis (2004.4.18-22. Tours, France)

小岸久美子 : 実験病理標本作製 京都大学技術職員専門研修 (2005.3.25)

松下降壽 : 小さい組織(小器官)の破損，紛失を防ぐ為のワンポイント紹介 実験病理組織技術研究第5回関西西部会病理技術研修 (2005.9.16. 大阪)

小岸久美子 : Fast Green-Safranin O 染色の検討 実験病理組織技術研究第5回関西西部会病理技術研修 (2005.9.16. 大阪)

4. ナノメディシン融合教育ユニット

Nano-Medicine Merger Education Unit

ナノメディシン融合教育ユニットは、ナノテクノロジーとライフサイエンス、並びに医学が融合して初めて実現できる「ナノメディシン」という新しい先端医工学領域において、将来、産学官で活躍できる人材を育成することを目的として開設された教育組織です。このユニットは京都大学の部局を横断した組織として位置づけられ、医学研究科、工学研究科及び再生医科学研究所が互いに連携しながら運営されます。教育においては既存の研究科・専攻という教育体系の枠組みを越えて、京都大学の豊富な教員スタッフと新たに採用された特任教員とが融合教育ユニットを形成してプログラムをコーディネートし、基礎知識、基礎技術の実習教育、研究指導に当たります。既に産官で研究者、技術者として活躍されている社会人にナノメディシンに関する基礎知識を講義により提供するとともに、基礎実習及び演習などの実技による再教育を行います。これにより、新領域において問題解決能力をもつ人材へと育成します。

また、神戸バイオテクノロジー研究・人材育成センターにおいては、再生医科学研究所のスタッフによりバイオテクノロジーの基礎実習が行われ、本ユニットの活動を通じて、神戸医療産業都市構想の推進に寄与するものでもあります。

We are proud of foundation of Nano-Medicine Merger Education Unit, which is an educational organization with the aim of nurturing talented experts who can drive translational research, display issue-solving ability, and create next-generation industry in terms of “nano-medicine” generated only by merger of nano-technology, life science, and medicine.

The unit is crossing over Graduate School of Medicine, Graduate School of Engineering, and Institute for Frontier Medical Sciences to make abundant human resources of Kyoto University and new designated researchers grow together, as the result of which we can provide coordinated and fundamental education programs efficiently.

It is an ultimate goal of this unit to contribute to nurturing talent with issue-solving ability in new fields by providing practice and basic lecture about nano-medicine for experts in engineering and research in a specific field.

The essential role of Institute for Frontier Medical Sciences concerned with the activity of this unit in Kobe Biotechnology Research and Human Resource Development Center is providing machinery, materials and staff, which means comprehensive support of hard- and software. It is a pleasure that we can contribute to the promotion of Kobe Medical Industry Development Project through the activity of this unit.

5. 学術集会

5－1 京都大学再生医科学研究所平成17年度学術講演会

(2005.12.22 芝蘭会館稲盛ホール)

| | | |
|---------------------------------|---------------------------|---------|
| 開会の挨拶 | 研究所長・発生分化研究分野・教授 | 中 辻 憲 夫 |
| 第1部 | | |
| 「ES細胞を用いた心血管分化研究 ―構成的発生生物学の試み―」 | 幹細胞分化制御研究領域・助教授 | 山 下 潤 |
| 「受精メカニズムの解明」 | 再生実験動物施設・助教授 | 近 藤 玄 |
| 「ES細胞における分化多能性と増殖」 | 再生誘導研究分野・教授 | 山 中 伸 弥 |
| 第2部 | | |
| 「組織形態分化誘導の新しい機構とその応用」 | 組織分化制御学研究部門(寄附研究部門)・特任助教授 | 平 井 洋 平 |
| 「正常および悪性造血における分化制御機構」 | 九州大学病院 遺伝子細胞療法部・教授 | 赤 司 浩 一 |
| 第3部 | | |
| 「関節軟骨における水和潤滑」 | ナノバイオメカニズム研究領域・教授 | 池 内 健 |
| 「1分子追跡・操作によって細胞のシグナルシステムを解く」 | ナノバイオプロセス研究領域・教授 | 楠 見 明 弘 |
| 「マイクロ加工技術を利用した生体分子1分子計測」 | 大阪大学産業科学研究所 高次細胞機能講座・教授 | 野 地 博 行 |

5-2 セミナー

| 開催日 | 講演者・所属 | 演 題 | セミナー名 | 主催分野 |
|------------|--|--|-----------------------|-------------------|
| 2005. 1. 7 | 今井 賢治 GSF 国立研究センター | 脊椎形成の発生分子遺伝学 | 生体分子設計学分野 セミナー | 生体分子設計学分野 |
| 2005. 1.22 | 近藤 淳 三菱ウェルファーマ株式会社 | 軟骨組織からのChM-I抽出効率と代謝 | 生体分子設計学分野 セミナー | 生体分子設計学分野 |
| 2005. 1.26 | 小椋 利彦 東北大学 加齢医学研究所 | The prepattern transcription factor <i>Irx2</i> , a target of the FGF8/MAP kinase cascade, regulates the cerebellum formation. | 生体分子設計学分野 セミナー | 生体分子設計学分野 |
| 2005. 2.15 | 遠藤 斗志也 名古屋大学大学院理学研究科 | ミトコンドリアへのタンパク質移行研究の新展開 | 第126回細胞生物学 セミナー | 細胞機能調節学分野 |
| 2005. 2.18 | 一條 秀憲 東京大学大学院薬学系研究科 | 酸化ストレスシグナルによる細胞死と自然免疫の制御 | 生体分子設計学分野 セミナー | 生体分子設計学分野 |
| 2005. 3.16 | 森 正敬 熊本大学大学院医学薬学研究部 | 尿素サイクルからミトコンドリア形成・分子シャペロン・小胞体ストレス病へ | 第127回細胞生物学 セミナー | 細胞機能調節学分野 |
| 2005. 4. 8 | 久保田 浩司 米国・ペンシルバニア大学獣医学部 | 精原幹細胞の自己複製と増殖因子 | 第2回再生誘導セ ミナー | 再生誘導研究分野 |
| 2005. 6.10 | 梅津 光生 早稲田大学大学院生命理工学専攻 | もの造り技術をどう使えば先進医療へ挑戦できるか | 組織修復セミナー | 組織修復材料学分野 |
| 2005. 6.15 | Daniel Choquet Center National pour la Recherche Scientifique | Single molecule imaging of glutamate receptor trafficking in neurons | ナノバイオプロセス 研究領域セミナー | ナノバイオプロセス 研究領域 |
| 2005. 6.15 | Justin Molloy MRC National Institute for Medical Research | Single molecule optical and mechanical studies of cellular myosins | ナノバイオプロセス 研究領域セミナー | ナノバイオプロセス 研究領域 |
| 2005. 6.17 | 田中 哲也 カナダ・トロント大学幹細胞ゲノム学研究室 | 胚性幹細胞の多分化機能性と細胞運命決定とに関わる制御因子のゲノム網羅的探索 | 第3回再生誘導セ ミナー | 再生誘導研究分野 |
| 2005. 6.28 | Paola Deprez Institut für Biochemie ETH, Switzerland | More than one glycan is needed for ER glucosidase II to allow entry of glycoproteins into the calnexin/calreticulin cycle | 第128回細胞生物学 セミナー | 細胞機能調節学分野 |
| 2005. 6.29 | 坂口 末廣 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 | ブリオン関連蛋白質の生物学 | 第2回再生実験動物 施設セミナー | 再生実験動物施設 |
| 2005. 7.11 | 服部 成介 東京大学医科学研究所 | プロテオーム解析による細胞内シグナル伝達の研究 | 再生増殖制御学セ ミナー | 再生増殖制御学分野 |
| 2005. 8. 5 | 大隅 典子 東北大学大学院医学系研究科 | 眼の正常発生及び先天異常における頭部神経堤細胞の関与 | 再生増殖制御学セ ミナー | 再生増殖制御学分野 |
| 2005. 9. 5 | 的場 亮 米国・国立衛生研究所 | マウス ES 細胞未分化能維持機構 | 第4回再生誘導セ ミナー | 再生誘導研究分野 |
| 2005. 9.20 | 手塚 建一 岐阜大学大学院医学系研究科 | 真の骨の形は計算できるか? ~計算機の進化がもたらす網羅的解析によるアプローチ~ | 生体分子設計学分野 セミナー | 生体分子設計学分野 |
| 2005. 9.26 | 西道 隆臣 理化学研究所脳科学総合研究センター | アミロイド代謝制御とアルツハイマー病 | 細胞工学・発生生物 学セミナー | 再生増殖制御学分野 |
| 2005. 9.30 | 池川 志郎 独立行政法人 理化学研究所 遺伝子多型研究センター 遺伝子多型研究センター | ゲノムから疾患へー骨・関節の common disease の感受性遺伝子の同定 | 生体分子設計学分野 セミナー | 生体分子設計学分野 |

| 開催日 | 講演者・所属 | 演 題 | セミナー名 | 主催分野 |
|------------|---|---|-------------------|---------------|
| 2005.10. 6 | Johannes Buchner Technical Univ.Munich, Germany | Molecular chaperones-cellular machines for protein folding | 第 129 回細胞生物学セミナー | 細胞機能調節学分野 |
| 2005.10.19 | 坂田 知世 ウィスコンシン大学 | OPTICAL SWITCHES: new molecular tools for reversible manipulation of bio-molecular interactions — Design, synthesis and applications— | ナノバイオプロセス研究領域セミナー | ナノバイオプロセス研究領域 |
| 2005.11. 8 | 荻野 俊郎 横浜国立大学大学院工学研究院 | カーボンナノチューブの成長とバイオテクノロジーへの応用 | 組織修復セミナー | 組織修復材料学分野 |
| 2005.12.12 | Thomas P. Zwaka Center for Cell and Gene Therapy and Dept. of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine | Programmed Cell Death Pathways are Essential for Maintaining Pluripotency | 第 6 回再生誘導セミナー | 再生誘導研究分野 |
| 2005.12.12 | Robert E. Braun Dept. of Genome Sciences, University of Washington School of Medicine | Adult Germ Line Stem Cell Self-Renewal in Mammals. | 第 5 回再生誘導セミナー | 再生誘導研究分野 |
| 2005.12.13 | Petros Koumoutsakos ETH Zurich | Particle simulations of diffusion in the lumen and on the surface of the endoplasmic reticulum | ナノバイオプロセス研究領域セミナー | ナノバイオプロセス研究領域 |
| 2005.12.20 | 近藤 元就 デューク大学メディカルセンター | リンパ球分化におけるサイトカイン受容体の機能 | 第 3 回再生実験動物施設セミナー | 再生実験動物施設 |

5－3 研究発表会

第1回再生研若手研究発表会プログラム(2005.3.9)

再生医科学研究所東館 5 階ルーフトラスにて

| 分野 | 氏 名 | 発表題目 |
|-------------|-----------|---|
| 生 体 機 能 調 節 | 八 木 治 彦 | ヒト CD25 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞の分化及び機能における FOXP3 遺伝子の役割 |
| | 吉 富 啓 之 | 関節リウマチモデルマウスにおける遺伝および環境因子の関与 |
| 生 体 材 料 | 木 村 祐 | 徐放化細胞増殖因子による生体組織の再生誘導 |
| | 井 上 幸 子 | 組織幹細胞の増殖、分化を促す scaffold 材料 |
| | 櫛 引 俊 宏 | 遺伝子発現レベルと持続性を高める遺伝子の DDS 技術 |
| | 城 潤 一 郎 | 非ウイルス遺伝子導入キャリアを用いた細胞－遺伝子ハイブリッド治療 |
| 細 胞 機 能 調 節 | 松 岡 泰 弘 | コラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の機能解析 |
| | 森 戸 大 介 | 小胞体関連分解に関わるユビキチンリガーゼの機能解析 |
| 器 官 形 成 応 用 | 漆 智 | Nicorandil による虚血性皮弁壊死の抑制効果 |
| 組 織 分 化 制 御 | 岡 由 美 子 | 軟骨形成におけるエピモルフィンの機能解析 |
| | 平 井 京 子 | 毛包再生・毛周期変動に伴う毛包組織の構造・分化状態の解析・制御 |
| 臓 器 再 建 応 用 | 市 原 理 司 | |
| | 福 田 正 順 | 再生医療を用いた臨床へのアプローチ |
| | 中 田 顕 | |
| 生 体 分 子 設 計 | 西 崎 有 利 子 | |
| | 泉 真 一 朗 | 間葉組織の血管侵入障壁 |
| | 三 浦 重 徳 | |
| ナノバイオメカニズム | 名嘉 マルコ 寛 | 関節軟骨および血管内の診断および治療方法に関する研究 |
| | 高 嶋 一 登 | |
| 幹 細 胞 加 工 | 黒 田 貴 雄 | 未分化性維持因子 Nanog の発現パターンと発現制御機構の解析 |
| | 山 口 新 平 | |
| 組 織 修 復 材 料 | 佐 藤 秀 樹 | 胚性幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導 |
| | 山 添 泰 宗 | ES 細胞からドーパミン産生神経細胞への分化誘導とその免疫隔離膜への封入 |
| | 藤 田 聡 | 不死化間葉系幹細胞株をもちいた臍帯血造血幹細胞の増幅 |
| | 山 内 文 生 | トランスフェクショナルアレイによる機能分子の探索 |
| | 有 馬 祐 介 | エバネッセント場を利用した生体－表面間相互作用の解析 |
| 組 織 再 生 応 用 | 吹 上 謙 一 | 間葉系幹細胞に関する研究 |
| | 大 塚 聖 視 | |
| | 柴 田 弘 太 郎 | |
| | 嶋 靖 子 | |
| 再 生 増 殖 制 御 | 正 木 め ぐ み | 脂肪組織形成におけるメルトリン α の機能 |
| | 横 関 智 一 | 成体維持における膜蛋白質 meltrin beta/ADAM19 のリガンド産生機構の解明 |
| シミュレーション医工学 | 東 高 志 | MR と生体力学シミュレーション・生体組織保存液の創製 |
| | 姜 有 峯 | |
| | 松 村 和 明 | |
| 再 生 免 疫 | 折 橋 郁 | BALB/c.CD45.1congenic マウスの免疫異常 |

5-4 学術講演会・シンポジウム・研究会

医工学フォーラムー2004 年度特別学術講演会ー (2005.2.23 京大会館 医工学フォーラム会長 筏 義人)

開会の挨拶

医工学フォーラム会長 筏 義人

1. 細胞増殖因子の徐放化を利用した骨再生誘導治療の実際
2. ES 細胞からのドーパミン分泌細胞の分化誘導とそのカプセル化
3. 新しい骨組織再生材料
4. 骨格筋の力学的シミュレーション
5. 関節軟骨の力学測定と機能評価
6. 生体機能を育てるための様々な道具
7. in situ Tissue Engineering とその臨床応用
8. 重症糖尿病治療の現状と髀島再生医療の展望
9. 間葉系幹細胞に関する期待と疑問

田畑 泰彦 (生体材料学分野)
 岩田 博夫 (組織修復材料学分野)
 田中 順三 (生体物性学分野)
 堤 定美 (ナノ再生医工学研究センター
シミュレーション医工学研究領域)
 池内 健 (ナノ再生医工学研究センター
ナノバイオメカニズム研究領域)
 富田 直秀 (国際融合創造センター創造部門
(生体・医療工学))
 中村 達雄 (臓器再建応用分野)
 角 昭一郎 (器官形成応用分野)
 戸口田淳也 (組織再生応用分野)

特別講演

Regulations for medical devices in China

Professor Xi Tingfei
 (Director, Center of Medical Devices National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products)

京都大学再生医科学研究所 附属幹細胞医学研究センターと 21 世紀 COE プログラム
 「融合的移植再生治療を目指す国際拠点形成」の共催による国際シンポジウム

Asia-Pacific Meeting on Human Embryonic Stem Cell Research

April 18, 2005 at Kyoto University

Martin Pera : Growth and differentiation of human embryonic stem cells
Hui Zhen Sheng : Embryonic stem cell lines from Chinese population and differentiation to skeletal muscle and liver cells
Norio Nakatsuji : Establishment and manipulation of human and monkey ES cell lines
Shin-Yong Moon : Stem Cell Research and Establishment of Cloned Human Embryonic Stem Cells
Mark Richards : The derivation, propagation, storage and gene expression of hESCs on human feeders
Ing-Ming Chiu : Prospects of human ES cell research in Taiwan
Pak Chung Ho : Prospects of human ES cell research in Hong Kong

特定領域研究「生殖細胞の発生プロセス・再プログラム化とエピジェネティクス」と
 特定領域研究「幹細胞の可塑性と未分化性維持機構」の共催による国際シンポジウム

International Symposium on “Germ Cells, Epigenetics, Reprogramming and Embryonic Stem Cells”

November 15-18, 2005 at Kyoto University

Anne McLaren : From primordial germ cells to pluripotent stem cells
Azim Surani : Epigenetic programming of the genome in the embryo and germ cells
Hiroyuki Sasaki : Role of de novo DNA methylation in gametogenesis and genomic imprinting
Tomohiro Kono : Parental responsibility to mammalian development
Kuniya Abe : Comprehensive analyses of genetic programs for mouse primordial germ cell development
Yasuhisa Matsui : Epigenetic control of meiosis
Toshiaki Noce : Vasa (Mvh)-expressing germ cells during in vivo development and in vitro culture of ES cells
Toru Nakano and Satomi Miyagawa : Mouse Piwi family genes in germ cell development and epigenetic gene regulation
Norio Nakatsuji and Shinichiro Chuma : Tudor-related proteins and the germ cell nuage in mice
Masaru Okabe : Easy sexing of preimplantation mouse embryos and observation of sex differentiation in germ cells and in blastocysts
Takashi Shinohara : Culture of mouse male germline stem cells

Kentaro Yomogida : Maintenance of germinal stem cell in the microenvironment
Yayoi Obata : Mechanism for establishment of sex-specific imprinting in mouse gametogenesis
Hans Schoeler : Reprogramming of somatic nuclei in oocytes and ES cells
Masaki Okano : Epigenetic regulation during mouse embryogenesis by DNA methylation
Anne Ferguson-Smith : Epigenetic control of gene activity and repression at imprinted domains
Fumitoshi Ishino : Retrotransposon-derived imprinted genes that are essential for placental formation and function in mice
Thomas Jenuwein : The epigenome in the context of the post-genomic era
Kunio Shiota : Genome-wide epigenetics of stem, germ, and somatic cells
Jean-Paul Renard, M. Rielland, A. Jouneau : Blastocysts obtained from embryonic or somatic nuclei exhibit early alteration in trophoblast growth both *in vivo* and *in vitro*
Xiangzhong Yang : Somatic cell cloning and nuclear reprogramming-state of the technology and my dreams
Yukio Tsunoda and Yoko Kato : Assessment of cloned embryo quality
Atsuo Ogura : Cloning mice from differentiated and undifferentiated cells
Teruhiko Wakayama : Normality of nuclear transfer embryonic mouse stem cell lines derived from adult somatic cells
Minoru Ko : Defining developmental potency by global expression profiling of stem cells
Takashi Yokota : Mechanism of self-renewal of mouse embryonic stem cells
Pierre Savatier : Cell-cycle control and self-renewal in ES cells.
Shinya Yamanaka : Pluripotency and the homeobox protein Nanog
Martin Pera : Control of self renewal and early lineage commitment of human embryonic stem cells
Hitoshi Niwa : Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation
George Daley : Directing ES cell fate : Germ lineage and trophoblast determination
Koji Eto : Embryonic stem cell-derived platelets having the potential of normal hemostasis
Austin Smith : From embryonic stem (ES) cells to neural stem (NS) cells
Ihor Lemischka : Exploring cell fate regulation in embryonic stem cells.

研究会「生きている現象は見えるか？」

(2005.11.28 京大会館 事務局:京都大学再生医科学研究所 生体分子設計学分野)

1. 丑田 公規 (理研) 蛍光相関分光を用いた関節軟骨組織の細胞外マトリックスの評価
2. 森 肇 (京工繊大) タンパク質分子をタンパク質結晶に固定化する? その目的と利用
3. 横田 秀夫 (理研) 生体内3次元構造観察と形状数値モデル化
4. 中林誠一郎 (埼玉大理) 非線形電気化学振動子集団の構成生物学的展開
5. 石原 美弥 (防衛医大) パルスレーザーを用いた軟骨再生医療の評価
6. 古川 英光 (北大理) 走査型顕微光散乱による生体ゲルのその場観察
7. 姫野龍太郎 (理研) ベタ超級スーパーコンピュータと生命シミュレーションへの挑戦
8. 佐藤 正人 (東海大医) 細胞シート工学を用いた関節軟骨再生の可能性
9. 手塚 建一 (岐阜大) 骨リモデリングシミュレーションで挑むテラーメイド再生医療
10. 井本 圭輔 (九大理) 血管内皮細胞によるネットワーク形成の数値モデル
11. 日臺 智明 (日大医) 二種類の細胞を混合することにより生じる新たな表現型
12. 開 祐司 (京大再生研) 軟骨細胞外スペースの特性と組織形成

6. 協議員・教職員・その他構成員名簿

◆ 京都大学再生医科学研究所協議員(所外) ◆

塩 田 浩 平 (京都大学大学院医学研究科教授)
 荒 木 光 彦 (京都大学大学院工学研究科教授)
 西 田 栄 介 (京都大学大学院生命科学研究科教授)
 伊 藤 紳三郎 (京都大学大学院工学研究科教授)
 鍋 島 陽 一 (京都大学大学院医学研究科教授)
 中 畑 龍 俊 (京都大学大学院医学研究科教授)

◆ 京都大学再生医科学研究所職員等 (平成 18 年 1 月 1 日現在) ◆

所 長 中 辻 憲 夫

■ 生体機能学研究部門 ■

〈細胞機能調節学分野〉

教授：永田和宏 助教授：細川暢子 助手：久保田広志 講師(非常勤)：河野憲二，中野明彦，永井健治
 技能職員：島田道子 教務補佐員：長束優子 事務補佐員：石田玉美 研究補助員：中川澄江，金森和美，門田真奈
 大学院生：森戸大介，中村純治，小田裕香子，久保田進，長澤孝治，北村 朗，石田義人，潮田 亮，奥井大介，平山尚志郎，
 藪上欣亮，新木和孝，石川善弘，里本健輔
 博士研究員：本間貴之，寶関 淳

〈生体微細構造学分野〉

講師：平芳一法 大学院生：法邑賢一

〈生体機能調節学分野〉

教授：坂口志文 助手：野村尚史，種田貴徳(特任) 講師(非常勤)：坂口教子，清水 淳
 教務補佐員：山本恵津子，吉田雅美 事務補佐員：吉村雅代
 大学院生：小野昌弘，廣田圭司，長濱寛二，杉本直志，鬼頭昭彦，橋本 求，大西 康
 研究員：山口智之，田中 聡，Kajsa Wing

〈生体システム制御学分野〉

教授：長澤丘司 COE 研究員：細野 晃 事務補佐員：佐藤瑞穂 民間等共同研究員：杉山立樹
 大学院生：三上 栄，小原洋志，野田麻実子，梶原 茜

〈生体再建学分野 (国内客員)〉

教授：小椋利彦 助教授：若山照彦

■ 生体組織工学研究部門 ■

〈生体分子設計学分野〉

教授：開 祐司 助教授：宿南知佐 助手：近藤俊哉 講師(非常勤)：近藤 淳，手塚建一，渥美忠男，今井賢治
 教務補佐員：滝本 晶 事務補佐員：久保友紀恵
 大学院生：三浦重徳，伊東良太，北川 章(休学中)，毛利公美 研究員：西崎有利子

〈生体材料学分野〉

教授：田畑泰彦 助手：山本雅哉 COE 研究員：北郷明成
 事務補佐員：馬場恭子

大学院生：井上幸子，木村 祐，城潤一郎，劉 健，高本智紹，岡崎有道，谷川麻世，野一尚子，猪飼智範，金谷 勲
今村正明，小川源太郎，岡空高広，竹越 穰，宮崎伸彦
受託研究員：山田正敏，渡辺耕平，雜賀 健，高橋一裕 日本学術振興会特別研究員：上田寛樹

〈組織修復材料学分野〉

教授：岩田博夫 助教授：加藤功一 講師(非常勤)：宇山良公，清水幸雄
事務補佐員：鈴木義子

大学院生：藤田 聡，藤本裕之，中路 正，三浦 傑，安藤知子，北原七恵，小野大三郎，金田成弘，宮崎寛子，山口歌奈子
教務補佐員：有馬祐介，山添泰宗，山内文生 産学官連携研究員：佐藤秀樹，井上祐貴
技術補佐員：中井勇介 研究員：戸田満秋，藤本沙織

〈生物物性学分野(国内客員)〉

教授：田中順三

■ 再生統御学研究部門 ■

〈発生分化研究分野〉

教授：中辻憲夫 産学官連携講師：川瀬栄八郎 助手：中馬新一郎 産学官連携研究員：長谷川光一
研究員：喜多村晃一 教務補佐員：森部江美子，久世敦美 技術補佐員：田中ます子
事務補佐員：酒井睦美，廣富ひとみ
大学院生：庄司昌伸，藤本康子，細川美穂子，Cowan, Aaron Balfour，田中 敬

〈再生誘導研究分野〉

教授：山中伸弥 助手：中川誠人 CREST 研究員：沖田圭介 CREST 技術員：一阪朋子，熊崎 恵
研究機関研究員：丸山昌良 日本学術振興会特別研究員：高橋和利，Marc P. A. Lewitzky
CREST 事務員：大内裕美
大学院生：村上未玲，小田泰昭，青井貴之，今村公紀，坪岡則子，平野孝明，三浦恭子，秦野久美子 学生部：中村友紀
国費留学生：ホン・ヒョンジョン

〈再生増殖制御学分野〉

教授：瀬原淳子 助手：栗崎知浩 特任助手：若月修二 研究機関研究員：越前谷美智子
事務補佐員：倉澤祥子
大学院生：正木めぐみ，入江直樹，湯本法弘，小松絃司，横関智一，大西絵理，王霄月

〈再生免疫学分野〉

助教授：喜納辰夫 助手：藤本真慈

■ 再生医学応用研究部門 ■

〈生体修復応用分野〉

(欠員中)

〈組織再生応用分野〉

教授：戸口田淳也 助手：青山朋樹
事務補佐員：安田尚代
大学院生：石部達也，安良 興，柴田弘太郎，嶋靖子，吹上謙一，光野芳樹，大塚聖視，上島大輔，布留守敏，山田栄治
研究生：金 永輝

〈器官形成応用分野〉

助教授：角昭一郎 講師(非常勤)：砂村真琴，日裏彰人
事務補佐員：服部綾子
大学院生：漆 智，柳井伍一 研究生：星野順一，佐竹晃 研修員：古賀まり

〈臓器再建応用分野〉

助教授：中村達雄 講師(非常勤)：早川克己，稲田有史，堀 義生，茂野啓示

事務補佐員：矢延聡枝 技術補佐員：岡西泰永

大学院生：福田正順，金 修一，中田 顕，中島 晋，中瀬有遠，市原理司，荒木政人，佐藤寿彦，小林丈士

研究生：糸井真一，河南里江子，岸上義弘，諸井奈美，井上勝也，田尾裕之

研修員：松野智宣，井上祐利

〈再生医学応用流動分野〉

(欠員中)

■ 附属再生実験動物施設 ■

施設長(兼)：坂口志文

助教授：近藤 玄 技術職員：出口央士 研究生：折橋 郁

技能補佐員：古卿智英，人見博子，岸本好子，山尾勝美，石丸英典，細田 勝，西山尚之，川本悦子，柴田 豊，山崎幸子

渡辺知子，野宮真佑美，浅野真由美，山下秀幸，廣田和子 JST：谷 妙子(研究補助員)

■ 附属幹細胞医学研究センター ■

センター長(兼)：中辻憲夫

〈霊長類胚性幹細胞研究領域〉

助教授：末盛博文 産学官連携助手：角 智行 産学官連携研究員：安近健太郎

民間等共同研究員：山内香織 事務補佐員：采女久実子 大学院生：石井隆道，安田晋也，安達啓子，恒吉法尋，馬場園豊

〈幹細胞分化制御研究領域〉

助教授：山下 潤 研究員(共同研究員)：平岡美奈 大学院生(派遣研究学生)：柳 堅徳

技術補佐員：中野亜紀子，井上恵美，喜多史代 大学院生：星野託広，植崎元太 教務補佐員：沖本きよみ

〈幹細胞加工研究領域〉

助教授：多田 高 民間等共同研究員：多田政子，尾辻智美，黒瀬裕子 事務補佐員：福地恵美

大学院生：黒田貴雄，松村寛行，山口新平，鈴木達也

〈細胞プロセッシング研究領域〉

客員教授：高橋恒夫

研究員(CPC 主任)：高田 圭

■ 附属ナノ再生医工学研究センター ■

センター長(兼)：堤 定美

〈ナノバイオプロセス研究領域〉

教授：楠見明弘 特任助手：鈴木健一，藤原敬宏

大学院生：石橋宗典，高橋英樹，西村博仁，吉田広人，梅村康浩

研究員(学振特別研究員)：中田千枝子，村越秀治 JST(ICORP)研究員：岩沢こころ，本田郁子，笠井倫志

JST(ICORP)技術員：坪井久恵，近藤順子，長谷川理恵，八原雅子 JST(ICORP)事務参事：山本照雄

JST(ICORP)事務員：大山三菜子

〈シミュレーション医工学研究領域〉

教授：堤 定美 助教授：玄 丞然 講師(非常勤)：南部敏之，茂木伸夫，菅原明喜，中島直喜

教務補佐員：東 高志，鄭 徳泳 事務補佐員：上村幸代，小柴里美 技術補佐員：橋本麻美

外国人共同研究者：馬 威，韓 東旭 大学院生：丘 進卿，金 学嬉，曹 漢姫，李 英哲，姜 有峯，中井隆介

衛藤大亮，蔡 毅，山本 宏，裴 庭胤，原田雅樹，山本貴士，島田義孝，福岡 敦

研究生：土肥健二，井汲憲治，城真理子，田中正利 特別研究派遣学生：韓 龍海

研修員：中村昌幸，山口武志 研究員：三島昭宏，松村和明，須賀井一

〈ナノバイオメカニズム研究領域〉

教授：池内 健 助手：都賀谷紀宏

事務補佐員：新川知子

大学院生：高嶋一登，寺田大樹

〈再生医工学研究領域（外国人客員）〉

（欠員中）

■ 寄附研究部門 ■

〈組織分化制御学研究部門〉

助教授(特任)：平井洋平 助手(特任)：青野真也

民間等共同研究員：池口直樹，岡由美子，山本祥也，武田裕嗣，平井京子 事務補佐員：奥田由美子

テクニカルアシスタント：山崎恭子

■ 技術部 ■

技術専門員：松下隆壽 技術専門職員：小岸久美子

■ 事務部 ■

事務長：伊東成治

総務掛長：吉村淳郎 主任：島本 博(休職) 技能職員：高沖悠子

事務補佐員：緒方康子，戸倉理恵子 派遣職員：松原陽子

研究協力掛長：小西喜久男 事務職員：田原美粧，横田夏子 事務補佐員：中瀬安子 派遣職員：沓拔淑子

会計掛長：北野和男 事務職員：奥村和彦，三浦真帆 事務補佐員：戸嶋素子

■ ナノメディシン融合教育ユニット ■

科学技術振興講師：平田大二 科学技術振興助手：外波弘之，寺村裕治

教務補佐員：井上加代子

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University 2005

京都大学再生医科学研究所年報 2005

2006 年 3 月 18 日 印刷 2006 年 3 月 25 日発行

発 行 京都大学再生医科学研究所

京都市左京区聖護院川原町53 〒606-8507

印 刷 (株)北斗プリント社
